

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

Scuola di Dottorato in Scienze Agrarie ed Agro-Alimentari

Corso di Dottorato in Agrobiologia e Agrochimica

Indirizzo Miglioramento Genetico e Orticoltura XXIV° ciclo



***“Identificazione e trasferimento di QTL coinvolti
nell’accumulo di antiossidanti nel frutto di pomodoro”***

Anno Accademico 2010/2011

TUTOR

Prof. Luigi Frusciante

DOTTORANDA

Dott.ssa Nadia Lombardi

CO-TUTOR

Prof.ssa Amalia Barone

Dr. Antonio Di Matteo

COORDINATORE DEL DOTTORATO

Prof. Matteo Lorito

INDICE

1. Introduzione

1.1 Origine e importanza economica del pomodoro	pag. 2
1.2 Il ruolo degli antiossidanti nell'uomo e negli animali	pag. 4
1.3 L'acido ascorbico	pag. 7
<i>La via biosintetica dell'AsA in pianta</i>	pag. 11
1.4 I fenilpropanoidi	pag. 13
<i>La via biosintetica dei fenilpropanoidi in pianta</i>	pag. 14
1.5 I carotenoidi	pag. 17
<i>La via biosintetica dei carotenoidi in pianta</i>	pag. 19
1.6 Ruolo dei metaboliti secondari nella difesa delle piante	pag. 22
1.7 Le Linee di Introgressione e QTL	pag. 23
1.8 I marcatori molecolari in pomodoro	pag. 26
1.9 Scopo della tesi	pag. 28

2. Materiali e metodi

2.1 Materiale vegetale	pag. 30
2.2 Condizioni di crescita delle piante	pag. 30
2.3 Caratterizzazione fenotipica	pag. 31
2.3.1 Contenuto in solidi solubili totali	pag. 31
2.3.2 Estrazione e quantificazione di acido ascorbico	pag. 31
2.3.3 Estrazione e quantificazione di fenoli	pag. 32
2.3.4 Estrazione e quantificazione dei carotenoidi	pag. 33
2.4 Analisi statistica dei dati fenotipici	pag. 33
2.5 Analisi molecolari: sviluppo dei marcatori CAPS	pag. 33
2.6 Estrazione di RNA totale	pag. 36
2.7 Analisi Real Time q-PCR	pag. 36

3. Risultati

3.1 Analisi della progenie IL12-4 x IL7-3	pag. 39
3.1.1 Selezione di marcatori polimorfici	pag. 39
3.1.2 Screening molecolare di piante F2	pag. 46
3.1.3 Screening molecolare di piante F3 allevate in serra	pag. 48
3.1.4 Screening molecolare di piante F3 allevate in campo	pag. 51
3.1.5 Mappaggio dei geni dell'introgressione IL12-4	pag. 55
3.1.6 Valutazione fenotipica dei doppi omozigoti	pag. 57
<i>Acido Ascorbico</i>	pag. 57
<i>Fenoli totali</i>	pag. 59
<i>Solidi solubili totali</i>	pag. 61

3.1.7 Analisi fenotipiche delle piante ricombinanti	pag. 63
3.2 Analisi della progenie IL6-3 x IL2-2	pag. 65
3.2.1 Selezione di marcatori polimorfici	pag. 65
3.2.2 Screening molecolare di piante F2	pag. 68
3.2.3 Valutazione del contenuto in carotenoidi	pag. 70
3.2.4 Analisi HPLC per il contenuto in carotenoidi nella sub IL2-2-1	pag. 72
3.2.5 Analisi trascrizionale dei geni del pathway dei carotenoidi	pag. 74

4. Discussione

4.1 Selezione assistita da marcatori molecolari	pag. 76
4.2 Antiossidanti nel frutto di pomodoro	pag. 79
4.2.1 Pyramiding di QTL per acido ascorbico, fenoli e solidi solubili	pag. 80
4.2.2 Pyramiding di QTL per carotenoidi	pag. 82
4.3 Selezione e analisi di sub-linee	pag. 84

5. Conclusioni	pag. 90
-----------------------	---------

6. Bibliografia	pag. 93
------------------------	---------

1 Introduzione

1.1 Origine e importanza economica del pomodoro

Il pomodoro (*Solanum lycopersicum* L., già nota come *Lycopersicon esculentum* Mill.) è una solanacea originaria del continente americano, con centro di origine localizzato nella regione Andina del Sud America. Probabilmente tale pianta è stata addomesticata oltre 1500 anni fa dai Maya e dagli Incas, che vivevano nell'area corrispondente all'attuale Messico. Dati recenti indicano che le accessioni di *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (precedentemente *L. esculentum*) furono importate nel XV secolo in Europa, per poi essere introdotte in Italia agli inizi del XVI secolo.

Inizialmente considerato velenoso, il pomodoro veniva utilizzato esclusivamente come pianta ornamentale, in virtù delle sue bacche colorate. Solo a partire dalla metà del XVI secolo se ne è iniziata la coltivazione come pianta ortiva e, di conseguenza, l'utilizzo del frutto nell'alimentazione. Dal primo decennio del 1800 ha acquisito una valenza economica, cresciuta in maniera esponenziale: arricchendosi di nuove varietà sempre più adatte all'ambiente mediterraneo, il pomodoro si è diffuso conquistando un posto di rilievo tra le piante da orto dei paesi mediterranei, differenziandosi in numerose tipologie da consumo, dallo stato fresco fino all'avvento della trasformazione industriale che ha permesso di avere pomodoro a disposizione durante tutto l'arco dell'anno grazie a diversi metodi di conservazione. La successiva selezione ed il miglioramento del prodotto hanno permesso di incrementare la sua diffusione tanto che, attualmente, è considerato una delle colture ortive più importanti al mondo.

Nel 2008 si è registrata una produzione mondiale di circa 130 milioni di tonnellate (FAOSTAT 2008; <http://faostat.fao.org>). Dalla **Tabella 1.1** si evince che la superficie mondiale coltivata a pomodoro è stata di poco superiore ai 5 milioni di ettari e il continente asiatico con oltre il 56% ha la quota maggiore, segue il continente africano con circa il 23% e al terzo posto troviamo l'Europa con i suoi 574 mila ettari.

Tabella 1.1: Produzione mondiale e superficie coltivata a pomodoro nell'anno 2008

Continente	Superficie (Ha)	% superficie	Produzione (ton)	% produzione
Africa	1.180.943	22.59	12.482.054	9.63
America	509.320	9.74	24.853.939	19.17
Asia	2.954.418	56.51	71.498.620	55.15
Europa	574.512	10.99	20.403.445	15.74
Oceania	8.690	0.17	411.825	0.32
Mondo	5.227.883		129.649.883	

Fonte: nostre elaborazioni dati FAOSTAT 2008

La Cina, gli Stati Uniti d'America, la Turchia, l'India e l'Italia sono i maggiori produttori. La Cina copre il 26% della produzione mondiale, il nostro Paese poco più del 4,5% con circa 6 milioni di tonnellate. Nel decennio 1998-2008, i cinque Paesi leader nella produzione di pomodoro sono stati sempre gli stessi, anche se hanno adottato una politica differente, tant'è che mentre la Cina ha aumentato la sua produzione di circa il 98% rispetto al 1998, l'America del 26%, la Turchia del 33% e l'India del 66%, l'Italia ha mantenuto gli stessi livelli sia in termini di produzione sia di superficie coltivata. Nonostante ciò, a livello europeo il nostro Paese è il principale produttore di pomodori, infatti copre oltre il 29% della produzione totale, che è di poco superiore ai 20 milioni e 400 mila tonnellate, confermando la sua posizione di Paese leader del settore. La resa produttiva si attesta intorno alle 51 tonnellate per ettaro, con un incremento del 5% rispetto alle 49 t/ha del 1998 (FAOSTAT 2008; <http://faostat.fao.org>).

In Italia, dove la sua coltivazione ha una lunga tradizione, il pomodoro è diffuso come coltura ortiva in tutta la penisola, anche se in pieno campo è coltivato soprattutto in Puglia, Campania, Emilia Romagna, Calabria e Sicilia. Secondo la destinazione del prodotto si distingue la coltura per consumo fresco, o da mensa, e quella da industria. Questa specie ha un posto importante nell'economia agricola italiana: è infatti al secondo posto, in valore lordo vendibile, tra le colture ortive, ed al quarto tra le colture erbacee. In Italia, circa il 65% della superficie investita a pomodoro è destinata alla coltivazione del pomodoro da industria, la cui importanza è legata essenzialmente all'attivazione dell'industria di trasformazione ed all'ingente flusso d'esportazione alimentato dai derivati di questa conversione.

Tra i derivati del pomodoro ottenuti dalla trasformazione industriale rivestono importanza predominante i concentrati (circa il 50% del prodotto trasformato, costituiti principalmente da doppio concentrato, con il 28% di residuo secco minimo) ed i pelati (30% del pomodoro trasformato). Il restante 20% della trasformazione è rappresentato da triturati, cubettati e polpe, passate e succhi. Concorrono, inoltre, a formare l'*agrobusiness* del pomodoro da industria: le aziende sementiere, quelle vivaistiche, quella dell'impiantistica industriale, della meccanica agraria ed, infine, del *packaging*. Queste sono tutte attività che presentano un'accentuata localizzazione tale da formare distretti agroalimentari molto specializzati ed economicamente rilevanti a livello internazionale come quello parmense-piacentino, campano (provincia di Salerno) e pugliese (provincia di Foggia). Secondo i dati ISTAT del 2008 la produzione nazionale di pomodoro da industria è stata pari a poco più di 4 milioni e 800 mila tonnellate, mentre la produzione di pomodoro da mensa si aggira su 1 milione e 100 mila tonnellate, di cui oltre 500 mila provengono dalle coltivazioni in serra. Le regioni italiane

leader nel settore per il pomodoro da industria sono la Puglia con il 31%, seguono l'Emilia Romagna (30%) e la Lombardia (con circa il 10%); per quello da mensa la Sicilia assume il primato con oltre il 22% della produzione nazionale, seguita dalla Campania e dall'Umbria entrambe con l'11% della produzione totale (ISTAT 2008; <http://agri.istat.it>).

Numerosi studi epidemiologici hanno evidenziato l'importanza nella dieta di frutta e verdura, al fine di prevenire l'insorgenza di malattie cardiovascolari ed alcune forme tumorali (Renaud *al.*, 1998; Temple, 2000). Particolare attenzione è stata dedicata ai derivati del pomodoro, poiché alcuni autori (Franceschi *al.*, 1994; Giovannucci *al.*, 1995) affermano che il consumo di pomodori e dei suoi derivati è inversamente correlato con il rischio d'insorgenza dei tumori all'apparato digerente ed alla prostata. È altresì noto che il pomodoro è uno dei costituenti base nella dieta mediterranea, associata da tempo ad una ridotta insorgenza delle malattie cardiovascolari. Inoltre, considerando che il maggiore, e forse unico, apporto di licopene nella dieta deriva proprio da questo frutto, gli stessi autori ritengono tale molecola responsabile della citata azione protettiva. Studi sperimentali riportano che il licopene esplica attività antiossidante (Levy *al.*, 1995) ed interferisce con la crescita delle cellule tumorali (Di Mascio *al.*, 1989; Clinton, 1998). Infatti i pomodori sono importanti fonti di sostanze (vitamina C, potassio ed acido folico, oltre che di carotenoidi) che possono rafforzare quest'azione preventiva.

Tra i diversi caratteri che determinano la qualità del frutto di pomodoro (conservabilità e consistenza del prodotto fresco, processività, aroma, sapore, potere nutrizionale, contenuto in composti "health-promoting" e salubrità, stabilità dei diversi aspetti in post-raccolta), particolare importanza assume il contenuto di antiossidanti. In pomodoro comincia a crescere l'interesse per un miglioramento genetico finalizzato all'incremento dei livelli di antiossidanti nel frutto, attuabile attraverso tradizionali metodi d'incrocio (Ronen *al.*, 1999, Zhang e Stommel, 2000) o mediante l'incorporazione di transgeni (Giuliano *al.*, 2000; Romer *al.*, 2000).

1.2 Il ruolo degli antiossidanti nell'uomo e negli animali

Gli antiossidanti sono molecole con potenziale di riduzione negativo in grado di fornire ai radicali liberi gli elettroni di cui sono privi ripristinando così l'equilibrio chimico del sistema in cui agiscono. Presupposto per funzionare da antiossidanti è che la loro forma radicalica, una volta ossidati, sia non reattiva o poco reattiva nei confronti delle altre molecole.

Nell'uomo e più in generale negli animali, gli antiossidanti devono essere introdotti con la dieta ed esplicano la loro azione a certi livelli di concentrazione, generalmente piuttosto bassi; quando le concentrazioni aumentano, alcuni composti possono diventare proossidanti favorendo la formazione di radicali (Shahidi e Naczk, 1995).

L'organismo umano si difende naturalmente dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) producendo degli antiossidanti endogeni come ad esempio gli enzimi superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT) e il metabolita glutatione. Superata una certa soglia è necessario un apporto esterno di antiossidanti. Pertanto solo una alimentazione completa ed equilibrata può garantire un'efficace azione antiossidativa. Per garantire un sufficiente apporto giornaliero di antiossidanti gli esperti consigliano un'alimentazione equilibrata ed un consumo giornaliero di almeno 500-600 grammi di frutta e verdura fresche e di stagione.

I composti antiossidanti contenuti in molti alimenti e bevande, essendo capaci di catturare le ROS, hanno quindi una grande importanza nella prevenzione e nella difesa delle malattie, rappresentando un fattore protettivo fondamentale per la salute umana. È noto, ad esempio, che la dieta Mediterranea, ricca di antiossidanti naturali, porta ad una riduzione dell'incidenza di problemi cardiovascolari e neuro-degenerativi. Il possibile meccanismo di azione degli antiossidanti è stato esplorato per la prima volta quando è stato individuato che una sostanza con attività anti-ossidativa è anche una sostanza che si ossida rapidamente. Le ricerche su come la vitamina E previene il processo di perossidazione lipidica hanno condotto all'identificazione degli antiossidanti come agenti riducenti che prevengono le reazioni ossidative, spesso cercando specie reattive dell'ossigeno prima che possono danneggiare le cellule.

Gli antiossidanti sono classificati in due grandi gruppi, a seconda che siano solubili in acqua (idrofili) o nei lipidi (idrofobi). In generale, gli antiossidanti idrosolubili reagiscono con gli ossidanti nel citoplasma cellulare e nel plasma, mentre quelli liposolubili proteggono le membrane cellulari dalla perossidazione lipidica. Questi composti possono essere sintetizzati dal corpo umano o ottenuti dalla dieta. I differenti antiossidanti sono presenti nei fluidi e nei tessuti corporei in un ampio intervallo di concentrazioni, come glutatione e ubiquinone presenti per la maggior parte nelle cellule, mentre altri come l'acido urico sono uniformemente distribuiti attraverso il corpo.

La quantità di protezione fornita da un antiossidante dipende quindi dalla sua concentrazione, dalla sua reattività verso la particolare specie reattiva dell'ossigeno considerata e dallo stato degli antiossidanti con cui interagisce. Quale parte del loro meccanismo di azione, gli

antiossidanti riducono i radicali liberi che vengono generati nelle cellule viventi come normale prodotto di scarto del metabolismo ossidativo.

Dal punto di vista biochimico, i radicali liberi sono molecole particolarmente instabili in quanto presentano uno o più elettroni spaiati nell'orbitale più esterno. Questo induce i radicali liberi alla ricerca del proprio equilibrio chimico tramite acquisizione degli elettroni mancanti da altre molecole che, di conseguenza, diventano a loro volta instabili e cercano un altro elettrone da altre molecole, innescando così un meccanismo di instabilità a "catena". L'alta reattività dei radicali liberi può causare reazioni spesso indesiderate e lesive per le cellule e, quindi, per i tessuti e per gli organi (Mitscher *et al.*, 1997; Wiseman e Halliwell, 1996; Berliner e Heinecke, 1996). Le malattie dell'apparato cardio-vascolare, diabete, alterazioni polmonari, sclerosi multipla, alcuni tipi di cancro come ad esempio quello polmonare, cataratta, diabete, epatiti, artrite reumatoide, malattie neurodegenerative (il morbo di Parkinson e il morbo di Alzheimer), nonché il processo di invecchiamento, sembrano essere correlate all'accumulo nell'organismo di tali specie molecolari tossiche (Buring e Hennekens, 1997; Steinmetz e Potter, 1996). Anche le reazioni biochimiche legate all'accumulo e rimozione dell'acido lattico dai muscoli affaticati, contribuiscono ad innalzare la soglia dei radicali liberi. In condizioni normali i radicali liberi nei sistemi biologici sono tenuti sotto controllo da fonti generatrici di antiossidanti, quali: enzimi (es. superossido dismutasi, glutazione perossidasi e catalasi); macro molecole (es. albumina, ceruloplasmina, ferritina ed altre proteine); micro molecole (es. acido ascorbico, glutazione, acido urico, tocoferoli, carotenoidi e (poli)-fenoli); ormoni (es. estrogeni, angiotensina, melatonine, etc.).

Diversi studi epidemiologici hanno indicato che il consumo frequente di antiossidanti naturali, essenzialmente introdotti nella dieta tramite frutta e vegetali, è associato ad una riduzione del rischio di contrarre malattie cardiovascolari e cancro (Renaud *et al.*, 1998; Temple, 2000). Block *et al.* (2004) hanno osservato che la vitamina C può ridurre i livelli di proteina Creattiva (CRP), un marker usato per monitorare l'infiammazione delle malattie cardiovascolari. E' noto che l'acido ascorbico è in grado di eliminare i radicali superossido e idrossilico, e di rigenerare i tocoferoli (Davey *et al.*, 2000).

La vitamina E mostra effetti protettivi contro le malattie cardiovascolari e coronariche per l'azione inibente l'ossidazione del colesterolo LDL.

Nell'uomo è particolarmente significativo il ruolo degli W- e N-carotenoidi che risultano coinvolti nella biosintesi di vitamina A, fattore essenziale per la riproduzione cellulare, per il normale sviluppo dell'embrione e del feto e per le funzioni visive (Zile, 1998). Vari studi

epidemiologici hanno dimostrato che una dieta ricca in carotenoidi è correlata ad una diminuzione del rischio di contrarre vari tipi di disordini degenerativi, inclusi alcuni tipi di cancro, malattie cardiovascolari e danni fotossidativi (Stahl e Sies, 2001). In particolare, il basso livello di N-carotene, nell'organismo, è associato ad un alto rischio di cancro, così come ad una maggiore possibilità di infarto in soggetti fumatori (Rice-Evans *al.*, 1997). Viceversa, eccessive concentrazioni di N-carotene nella dieta sembrano avere un effetto pro-ossidante (Palozza, 1998). Oltre che contrastare i radicali liberi, i composti fenolici svolgono numerose attività biologiche come la protezione dei capillari sanguigni, l'azione antinfiammatoria, antibatterica, immuno-stimolante, antiallergica, antivirale, estrogenica ed anticancerogena (Robards e Antolovich, 1997; Czeaczot, 2000; Kuntz *al.*, 1999). E' stata inoltre dimostrata la loro azione inibente nei confronti di alcuni enzimi, quali la fosfolipasi A2, la cicloossigenasi, la glutatione riduttasi e la xantina ossidasi (Havsteen, 2002). Havsteen (2002) ha osservato che i polifenoli posseggono attività antivirale nei confronti dell'HIV, dell'Herpes simplex, di vari virus influenzali e del Rhinovirus. Il contenuto totale di polifenoli è risultato fortemente correlato con l'attività antiossidante e vasodilatatoria. All'interno delle varie classi di composti fenolici, la maggiore attività antiossidante è stata esibita dall'acido gallico. I flavonoidi, più che gli acidi fenolici, hanno un notevole effetto protettivo nei confronti delle LDL (low density lipoprotein). Tale fenomeno è stato ampiamente studiato in quanto si ritiene strettamente connesso con le fasi iniziali nel processo di aterosclerosi. Uno studio condotto da Chen *et al.* (1995) ha rivelato che l'epigallocatechingallato (EGCG) inibisce la crescita delle cellule del cancro del colonrettale.

Infine, anche ai lignani sono state attribuite proprietà antiossidanti ed effetti anticancerogeni. In particolare, i lignani sono in grado di ridurre la produzione di ROS in alcuni tipi di cellule tumorali e del sistema immunitario (Cassidy, 1996).

1.3 L'acido ascorbico

La vitamina C, conosciuta anche come acido ascorbico, è un composto idrosolubile simile al glucosio. Benché abbastanza stabile in soluzione acida, è di norma la meno stabile delle vitamine ed è molto sensibile alla luce, al calore e all'aria, che stimolano l'attività degli enzimi ossidativi.

Una sua funzione molto importante è quella di mantenere in attività il collagene, una proteina necessaria per la formazione del tessuto connettivo della pelle, dei legamenti e delle ossa.

L'acido ascorbico esiste in due forme enantiomere ma solo una di esse, l'enantiomero (5R)-5-[(1S)-1,2-diidrossietil]-3,4-diidrossifurano-2(5H)-one, è la vitamina C. L'acido L-ascorbico (AsA) è una molecola con proprietà di elettrone-donatore con un potere antiossidante di primaria importanza nel mondo dei viventi. Grazie alla forte azione riducente, la vitamina C è utilizzata in molte reazioni di ossidoriduzione. In particolare la vitamina è in grado di donare un elettrone, formando così l'acido semideidroascorbico il quale può donare un secondo elettrone, generando così l'acido deidroascorbico. Ciò fa della vitamina C un valido donatore di elettroni. Il prodotto finale delle reazioni descritte, l'acido deidroascorbico, può venir ridotto ad opera di un enzima dipendente dal glutatione, la deidroascorbato reduttasi, rigenerando, così, l'acido ascorbico. Essa ha relazioni significative con altri elementi nutritivi. Contribuisce al metabolismo di alcuni aminoacidi come la fenilalanina e la tirosina che diventano ormoni.

La vitamina C trasforma le forme inattive di acido folico in forma attiva di acido folinico e può avere un ruolo significativo nel metabolismo del calcio e del ferro. Inoltre protegge la tiamina, la riboflavina, l'acido folico, l'acido pantotenico, le vitamine A ed E dall'ossidazione.

La spiccata azione antiossidante della vitamina C e la sua capacità di mantenere stabili le vitamine A, E, l'acido folico e la tiamina, viene utilizzata dalle industrie come additivo nei cibi (come tale o sotto forma di sale sodico, potassico e calcico).

La molecola è una vitamina idrosolubile, possiede infatti un discreto numero di legami polari che la rendono polare e quindi solubile in acqua. A differenza delle vitamine liposolubili (A, D, E, K) che sciogliendosi nel grasso dei tessuti danno luogo facilmente a problemi di accumulo con la possibile insorgenza di ipervitaminosi, le vitamine idrosolubili come l'acido ascorbico non danno fenomeni di accumulo poiché il loro eccesso viene eliminato quotidianamente dal corpo umano ed è per questo che devono essere assunte regolarmente.

Nell'uomo il fabbisogno giornaliero di vitamina C deve essere soddisfatto mediante apporto alimentare mancando, similmente ai primati ed alla *Cavia porcella*, della capacità di sintesi di tale molecola. Tale deficienza deriva dal fatto che l'enzima che

catalizza la reazione terminale della via biosintetica dell'AsA é inattivo a causa di mutazioni accumulate nella sequenza (Sato e Udenfriend, 1978).

Le proprietà antiossidanti della Vitamina C sono state dimostrate in esperimenti in vitro. Malattie come arterosclerosi e cancro derivano da danni di ossidazione delle cellule. Studi epidemiologici hanno messo in evidenza che diete con elevato contenuto in frutta e verdure sono associate ad un diminuito rischio di malattie cardiovascolari, ictus e cancro, formazione di cataratte e con aumentata longevità. In più, la vitamina C é stata direttamente implicata nella riduzione del rischio di malattie degenerative (Gey, 1998). Inoltre, la specifica funzione dell'AsA nella sintesi del collagene ne fa una molecola importante per la formazione ed il mantenimento della cartilagine, del tessuto osseo, della pelle e dei denti ed é generalmente riconosciuta all'AsA la proprietà di potenziare l'attività dei linfociti e del sistema immunitario in generale (Padayatty *al.*, 2003; Davey *al.*, 2000).

Alla luce della riduzione del rischio di contrazione di malattie, organismi scientifici internazionali raccomandano la revisione delle soglie segnalate o richieste di assunzione giornaliera di Vitamina C, anche alla luce della biodisponibilità di tale composto per l'organismo umano (Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, Washington DC, NAS 1997). In tal senso, sarebbe auspicabile un incremento del contenuto in AsA nei prodotti agro-alimentari primari favorendo così il miglioramento del valore della dieta con diretto beneficio della salute delle popolazioni consumatrici.

L'acido L-ascorbico nelle piante riveste funzioni di primaria importanza nella fisiologia degli stress così come nei processi di crescita e sviluppo.

In particolare le funzioni possono essere così sintetizzate:

- l'AsA é un antiossidante chiave per la sua capacità di detossificare l'ossigeno reattivo (ROS);
- come cofattore, l'AsA gioca un ruolo significativo nella fotoprotezione, nella risposta alle ferite, così come nella risposta all'invasione di organismi parassiti e patogeni, nell'espansione e nella divisione cellulare;
- l'AsA é, inoltre, precursore di ossalato e tartrato.

Il controllo del livello cellulare di ROS é ottenuto mediante l'azione combinata di una rete interconnessa di antiossidanti all'interno della quale l'AsA ha la capacità di eliminare ROS mediante meccanismi multipli. Infatti, l'AsA ha la capacità di eliminare direttamente molti differenti ROS come singoletti di ossigeno, superossido e radicali idrossile (Padh, 1990).

L'AsA é anche coinvolto nella rigenerazione dell'antiossidante di membrana α -tocoferolo mantenendolo nella forma ridotta (Liebler, Kling e Reed, 1986) ed indirettamente elimina il H_2O_2 attraverso l'attività dell'ascorbato perossidasi (Asada, 1992). Molti studi hanno concentrato la loro attenzione sulla conseguenza di uno stress ossidativo sullo stato dell'AsA in pianta. Spesso, il pool di AsA é stato trovato incrementare il suo stato di ossidazione come conseguenza di una aumentata ossidazione e/o di una inefficiente rigenerazione. La perdita di un elettrone da parte dell'AsA risulta nella formazione di monodeidroascorbato MDA il quale é estremamente instabile e disproporziona ad AsA e deidroascorbato (DHA). Sia MDA che DHA possono essere ridotti ad AsA attraverso l'attività delle riduttasi (Foyer e Halliwell, 1976). Il radicale MDA aumenta in molte specie vegetali come risposta ad una ampia varietà di stress generanti ROS ivi inclusi erbicidi redox-attivi come il paraquat, cianide, elevata intensità luminosa, carenza idrica e senescenza (Herbert *et al.*, 1996). Inoltre, lo stato redox dell'AsA é almeno in parte dipendente dalla quantità di ascorbato contenuto nei tessuti.

L'AsA svolge un ruolo importante nella fotoprotezione. La concentrazione dell'AsA aumenta nelle piante esposte ad elevate intensità luminose. Il suo ruolo nella fotoprotezione si estrinseca attraverso la sua azione come cofattore nel ciclo delle xantofille (Eskling *et al.*, 1997).

Il livello di AsA é osservato essere generalmente elevato nei tessuti meristematici e ridotto in tessuti ad attività moltiplicativa molto bassa come il centro quiescente delle radici di mais (Smirnoff *et al.*, 1996)

Smirnoff (1996) ipotizza che la parete cellulare genera MDA attraverso l'ascorbato ossidasi e riduce MDA ad AsA attraverso il citocromo c. Quest'ultima molecola é localizzata sulla membrana citoplasmatica e richiede NAD(P)H per la sua azione. Tale AsA viene poi trasportato nell'apoplasto. In tale ciclo il flusso elettronico attraverso la membrana cellulare sarebbe coinvolto nella espansione cellulare attraverso la teoria della crescita in ambiente acido (Rayle e Cleland, 1992).

AsA e DHA potrebbero influenzare i legami incrociati tra proteine della parete e polisaccaridi, lignificazione, accumulo di calcio e quindi contribuire al controllo della espansione cellulare (Smirnoff *et al.*, 1996).

Infine, la rottura dello scheletro carbonioso dell'AsA conduce alla formazione di ossalato e tartrato. L'ossalato é stato proposto essere coinvolto nella osmoregolazione, nel controllo della concentrazione del calcio e nella espansione della parete cellulare (Smirnoff *et al.*,

1996). La conversione dell'AsA a tartrato in vite è regolata con lo sviluppo e limitata all'antesi ed è determinata dalla localizzazione relativa della foglia rispetto al frutto (Saito e Loewus, 1979).

La via biosintetica dell'AsA in pianta

In pianta il pathway biosintetico più frequentemente osservato nella sintesi della Vitamina C coinvolge forme attivate degli zuccheri GDP-D-mannosio, GDP-L-galattosio and L-galattosio ed infine L-galactono-1,4-lattone che è convertito a L-acido ascorbico (Wheeler *et al.*, 1998; Valpuesta e Botella, 2004; Wolucka *et al.*, 2005) (**Figura 1.1**). L'identificazione di mutanti *vtc* di *Arabidopsis* (Conklin *et al.*, 2000) che producono minor quantità di acido ascorbico hanno confermato il ruolo essenziale degli intermedi del pathway e di alcuni enzimi come GDP-mannosio pirofosforilasi (GMP; *vtc1*) (Conklin *et al.*, 1999) e L-galattosio-1-P fosfatasi (*vtc4*) (Conklin *et al.*, 2006). E' stato identificato anche un pathway alternativo che utilizza GDP-gulosio and L-gulosio (Wolucka *et al.*, 2005); in fragola e nell'uva è stato identificato anche un terzo pathway che prevede la trasformazione di acido D-galatturonico ad acido L-ascorbico passando per l' L-galattono-1,4-lattone (Agius *et al.*, 2003; Cruz-Rus *et al.*, 2010). Esiste anche un pathway per il riciclo dell'acido ascorbico. A causa del suo ruolo come antiossidante, l'ascorbato ridotto è ossidato in un radicale instabile, il monodeidroascorbato il quale disproporziona in ascorbato e deidroascorbato. Il deidroascorbato è anche esso instabile ed è rapidamente degradato. In questo modo il pool di ascorbato può essere riformato dalle sue forme ossidate per mezzo di due reduttasi che sono la monodeidroascorbato reduttasi (MDHAR) e la deidroascorbato reduttasi (DHAR) (Noctor e Foyer, 1998; Smirnoff e Wheeler, 2000). La modulazione dell'attività della DHAR può controllare i livelli di ascorbato nei tessuti. Infatti l'over-espressione di questo enzima in tabacco aumenta i livelli di ascorbato di 2-4 volte (Chen *et al.*, 2003). La regolazione dei livelli dell'ascorbato nella cellula è quindi strettamente controllato dai livelli di sintesi, di riciclo, di degradazione (Pallanca e Smirnoff, 2000; Green e Fry, 2005) e di trasporto (Horemans *et al.*, 2000) sebbene poco è conosciuto circa gli ultimi due processi.

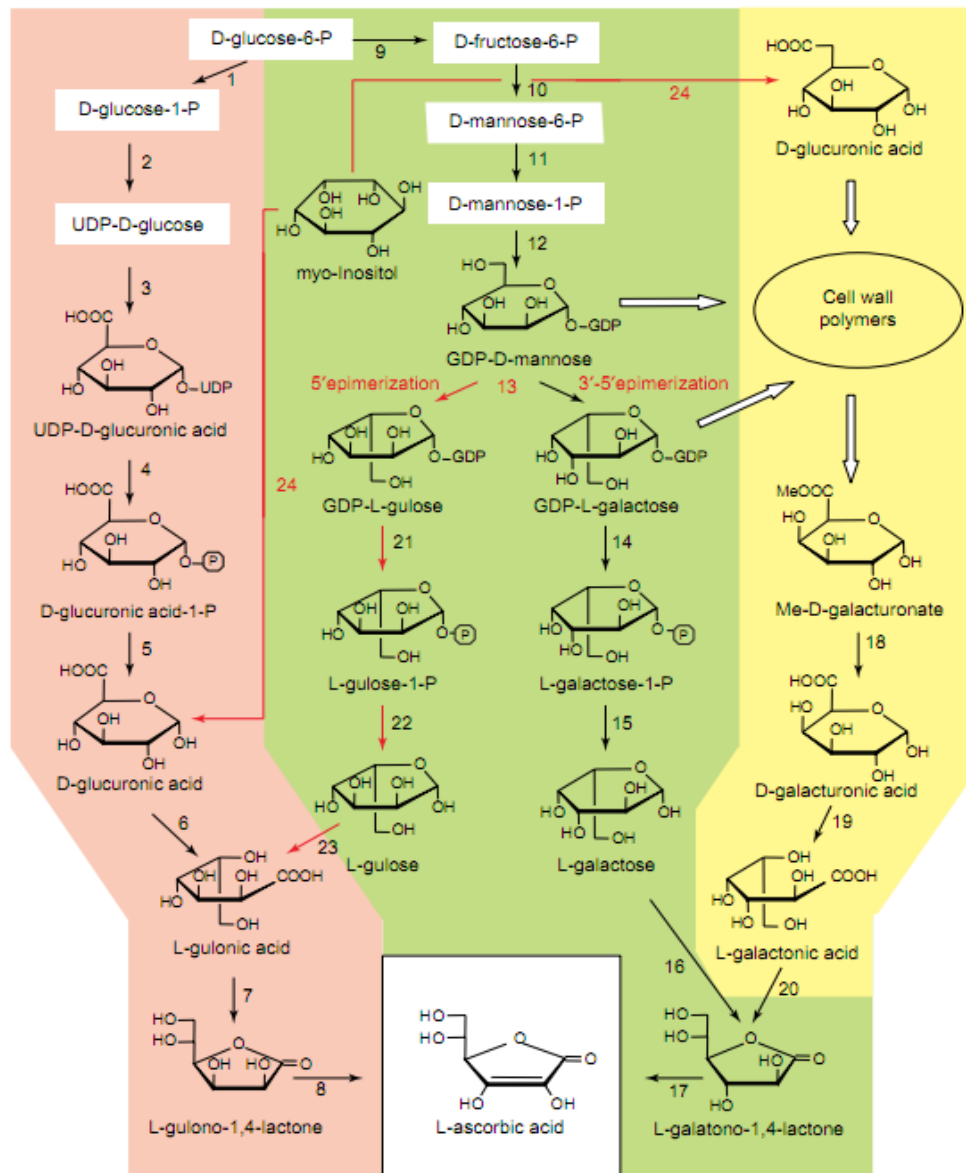


Figura 1.1. Vie biosintetiche dell'acido ascorbico in pianta.

1.4 I fenilpropanoidi

I fenilpropanoidi rappresentano uno dei maggiori gruppi di metaboliti secondari delle piante e comprendono isoflavoni, flavonoidi, stilbeni, antocianine, flavononi, tannini condensati e lignina (Moyano *et al.*, 1996). Tutti questi sono composti caratterizzati dalla presenza di un anello aromatico con una catena alifatica laterale a tre atomi di carbonio (Shadle *et al.*, 2003). I fenilpropanoidi svolgono un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella riproduzione delle piante: sono coinvolti, infatti, nella formazione dei tessuti vascolari, nella pigmentazione dei fiori, nei meccanismi di difesa e nella protezione dai raggi UV (Iriti e Foaro, 2003).

I fenoli sono antiossidanti a funzioni multiple: possono agire come agenti riducenti, antiossidanti donatori di idrogeno, quencher di ossigeno singoletto e agenti chelanti dei cationi metallici. L'attività antiossidante dei composti fenolici è dovuta alla presenza di gruppi idrossilici legati alle strutture aromatiche ed alla geometria della molecola (**Figura 1.2**). Le condizioni fondamentali, affinché sia esplicata l'attività antiossidante sono: la presenza degli antiossidanti in basse concentrazioni, rispetto al substrato di ossidazione, per ritardare o prevenire l'autossidazione o l'ossidazione mediata da radicali (Halliwell e Gutteridge, 1990) e la formazione di radicali fenolici stabili attraverso la delocalizzazione elettronica sulle strutture aromatiche ed alifatiche.

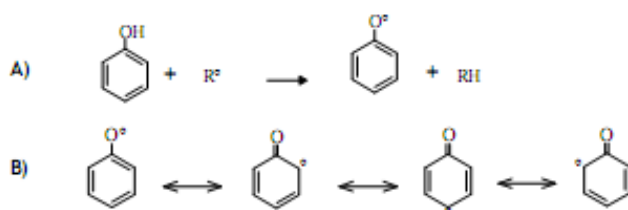


Figura 1.2 reazione generica di un composto fenolico con un radicale libero (A); la delocalizzazione dell'elettrone dell'ossigeno sull'anello aromatico contribuisce alla stabilizzazione della nuova specie radicalica formata (B).

L'attività antiossidante dei flavonoidi, ed il loro metabolismo in vitro, dipende anche dalla posizione dei gruppi funzionali nella struttura (Heim *et al.*, 2002).

La configurazione idrossilica dell'anello B è significativamente determinante per l'azione scavenging nei confronti dei ROS e degli RNS (specie reattive dell'azoto). Gli idrossili di

tale anello cedono idrogeno, o un elettrone, ai radicali idrossilici, perossilici e perossinitriti stabilizzandoli, e trasformandosi a loro volta in un radicale flavonoide relativamente stabile. Gli ossidrili presenti sull'anello A (**Figura 1.2**) hanno un'attività antiossidante decisamente più blanda rispetto a quelli dell'anello B. Tuttavia, in alcuni isoflavonoidi, i gruppi OH presenti in posizione 5 contribuiscono ad aumentarne la capacità antiossidante ed hanno una spiccata abilità scavenging nei confronti dei radicali perossinitrito. Anche l'eterociclo contribuisce all'attività antiossidante per la presenza di un OH libero in posizione 3, perché permette la coniugazione tra i due anelli aromatici A e B. Non è essenziale, ai fini dell'attività antiossidante, la presenza dell'eterociclo chiuso, dato che i calconi mostrano comunque una spiccata attività antiossidante.

L'angolo di torsione dell'anello B, rispetto al resto della molecola, condiziona le proprietà di "free radical scavenger". La planarità permette una migliore delocalizzazione elettronica e, di conseguenza, una maggior stabilità del radicale fenossilico dei flavonoidi.

Il grado di polimerizzazione e le proprietà chelanti dei flavonoidi e dei tannini influenzano l'attività antiossidante. Riassumendo si può dire che i fenoli sono donatori effettivi di idrogeno; in particolare, sono molto attivi, in questo senso, i flavonoli come la quercetina (Rice-Evans *et al.*, 1995), i flavanoli come gli esteri dei catechin-gallati del tè verde e nero (Salah *et al.*, 1995), le antocianine del vino (Frankel *et al.*, 1993), ed i prenilpropanoidi (Castelluccio *et al.*, 1995), quali l'acido clorogenico del succo di mela (Miller *et al.*, 1995).

La via biosintetica dei fenilpropanoidi in pianta

I fenilpropanoidi hanno come precursore comune la fenilalanina, a sua volta sintetizzata attraverso la via dello scichimato, dalla quale vengono prodotti gli amminoacidi aromatici utilizzati come scheletri di base per la produzione di acidi fenolici.

La biosintesi dei fenilpropanoidi inizia con la deaminazione della fenilalanina, proveniente dalla via dello schimato, che porta alla formazione dell'acido cinnamico (**Figura 1.3**). Questa reazione è catalizzata dall'enzima L-fenilalanina ammonio-liasi (PAL), enzima chiave per la produzione di diversi acidi fenolici (Iriti e Foaro, 2003). Successivamente, l'acido cinnamico viene convertito in p-cumarato dall'azione dell'enzima cinnamato 4-idrolasi. L'acido p-cumarico è il precursore comune di due diramazioni della via biosintetica: infatti, il p-cumarato può entrare in una via laterale che porta, tramite l'azione di tre enzimi, la 4-cumarato 3-idrossilasi, la 4-cumaroil CoA-ligasi e la idrossicinnamato-

CoA chinato trasferasi, alla formazione di acido clorogenico, oppure può portare alla sintesi di p-cumaroil-CoA-ligasi. Il p-cumaroil-CoA può, successivamente, essere usato come substrato per la formazione di lignine o proseguire nella via biosintetica che porta alla formazione delle antocianine. In questo caso, tramite l'azione della calcone sintetasi, enzima chiave nella formazione delle antocianine, si ha la produzione di calcone, dal quale, attraverso altri cinque passaggi, catalizzati dalla calcone flavone isomerasi, la flavone 3-idrossilasi, la diidroflavonolo 4-reduttasi, la leucoantocianidina diossigenasi e la glucosio-flavonol glucosio trasferasi, si ha la formazione di antocianine.

Negli ultimi anni sono stati fatti notevoli progressi nell'elucidazione della biosintesi dei flavonoidi. Restano, però, ancora da chiarire alcuni aspetti relativi agli ultimi stadi della sintesi delle antocianine, alla sintesi dell'epicatechina e delle proantocianidine ed, infine, relativamente alla sintesi di alcune classi di flavonoidi numericamente meno consistenti, quali auron e diidrocalconi.

Tutti gli enzimi coinvolti nella via biosintetica dei flavonoidi, eccetto la flavonol sintasi, che è codificata da 6 geni, sono codificati da una singola coppia di geni. Gli enzimi della via dei fenilpropanoidi funzionano probabilmente come complessi multienzimatici che facilitano il diretto trasferimento e la canalizzazione degli intermedi tra i diversi siti attivi.

Si verifica quindi una competizione fra i vari punti di ramificazione all'interno di queste vie, gli intermedi sono altamente reattivi e potenzialmente tossici e le massime concentrazioni di questi intermedi sono molto basse. Questa organizzazione è legata alla necessità per queste vie metaboliche di rispondere velocemente ai segnali esterni ed interni per cambiare le quantità e i tipi di prodotti finali che devono essere sintetizzati.

La funzione fondamentale di questo gruppo di sostanze naturali presenti quasi esclusivamente nelle piante superiori, è quella di impartire una colorazione ai fiori, ma anche ai frutti e talora alle foglie. Molti flavonoidi hanno una colorazione gialla o giallastra, che rende ragione del loro nome (dal latino *flavus*, giallo). Oltre a determinare tali bellissime pigmentazioni, i flavonoidi hanno un ruolo chiave anche nel complesso sistema di segnali tra piante e microbi, nella fertilità maschile di alcune specie, come deterrenti per la predazione e nella difesa come agenti antimicrobici. Il ruolo svolto dai flavonoidi nella protezione della pianta nei confronti di attacchi microbici vede coinvolta non solo la loro presenza come agenti costitutivi, ma anche il loro accumulo in funzione di fitoalessine (Hartborne e Williams, 2000). I flavonoidi, soprattutto isoflavonoidi e flavanoni hanno inoltre la capacità di inibire la germinazione delle spore dei patogeni fungini delle piante.

1.5 I carotenoidi

I carotenoidi sono molecole costituite da una lunga catena di atomi di carbonio (costituita da 35-40 atomi e definita catena polienica), spesso terminante in un anello. La struttura della catena permette di dividere i carotenoidi in due classi:

- le xantofille, costituite da catene contenenti atomi di ossigeno. Appartengono a questa classe importanti pigmenti come la luteina e la zeaxantina.
- i caroteni, costituiti invece da molecole prive di ossigeno e formate solo da idrogeno, oltre che da carbonio. Appartengono a questa classe il licopene ed il carotene, che è forse il più conosciuto di questi pigmenti e che dà il nome alla classe, contenuto nelle carote e responsabile del tipico colore arancione di questa radice.

Il tipico colore dei carotenoidi, che spazia dal giallo pallido all'arancione fino al rosso acceso, è una diretta conseguenza della struttura molecolare di questi composti. Le catene polimeriche che li compongono sono infatti caratterizzate dalla presenza di doppi legami, che interagiscono tra di loro permettendo agli elettroni degli atomi interessati di muoversi più liberamente; all'aumentare dei doppi legami nella catena, aumenta anche la libertà di movimento degli elettroni. Questo fatto fa sì che lo spettro della luce assorbita da queste molecole diminuisca; come conseguenza di ciò, aumenta la lunghezza d'onda della luce riflessa, ed essa appare perciò di un colore tendente al rosso.

Negli organismi fotosintetici, i carotenoidi giocano un ruolo centrale nel processo di fotosintesi: infatti da una parte prendono parte alla catena di trasporto dell'energia, e dall'altra proteggono il centro di reazione dall'ossidazione. Negli organismi non fotosintetici, invece, queste molecole sembrano avere un ruolo importante nei meccanismi anti-ossidativi.

I carotenoidi possiedono molte proprietà fisiologiche, e hanno importanti effetti sia nelle piante che in altri organismi. A causa della loro particolare struttura molecolare, sono capaci di legare ed eliminare i radicali liberi, e giocano in questo senso un ruolo importante nel sistema immunitario dei vertebrati. Inoltre, studi epidemiologici hanno evidenziato come le persone con elevati livelli di β -carotene mostrino più bassi rischi di contrarre il cancro ai polmoni.

Gli animali sono incapaci di sintetizzare i carotenoidi, e devono necessariamente assumerli tramite la dieta. Il loro assorbimento dalle fonti naturalmente disponibili è molto limitato: dalle carote si può assorbire in genere solo il 5% di β -carotene, a causa di una matrice

complessa di polisaccaridi digeribili ed indigeribili e proteine; il licopene presente nei pomodori è più assimilabile se assunto sotto forma di succo o conserva rispetto al frutto fresco e non trattato.

Attualmente, esistono oltre 600 tipi di carotenoidi conosciuti, e nonostante la loro simile composizione chimica, posseggono nomi assai diversi, correlati alla fonte biologica da cui sono stati isolati per la prima volta, dalla quale richiamano la denominazione botanica. I carotenoidi sono stati isolati dalle piante, o da altri organismi fotosintetici, come le alghe ed alcune specie di funghi e di batteri. Nell'organismo animale sono talvolta presenti sotto forma di composti proteici o lipidici che ne mascherano il colore (mimetismo animale).

I carotenoidi sono usati largamente come coloranti naturali non tossici e trovano il loro massimo impiego nei cibi, bevande, dolci cosmetici ed alimenti per animali.

Nelle piante sono presenti oltre che nei frutti e nei fiori anche nei cloroplasti dei tessuti verdi (foglie, steli e erba) dove il loro colore viene mascherato da quello della clorofilla, che affiancano nel processo fotosintetico, generalmente complessati con proteine. Sono piuttosto rari nelle radici, anche se ci sono notevoli eccezioni, come nel caso delle carote dove sono presenti in grandi quantità. Anche alcuni semi sono colorati dai carotenoidi, come nel caso del mais che deve il suo colore alla zeaxantina.

I carotenoidi hanno un rilevante ruolo nella protezione delle piante dalla grande produzione di radicali liberi che si verifica durante il processo fotosintetico.

Dei più di 600 carotenoidi naturali conosciuti, solo una ventina si ritrovano nei tessuti e nel plasma umano; tra questi ci sono il licopene, il β carotene, la luteina e la zeaxantina. Questi composti sono necessari per un miglior funzionamento dell'organismo, svolgendo diverse funzioni biologiche molto complesse che si esplicano in più direzioni.

- vengono metabolizzati per produrre vitamina A e acido retinico
- riducono la genotossicità di molti inquinanti endogeni ed esogeni
- riducono la presenza delle lesioni precancerose nell'uomo
- modificano la risposta immunitaria nei mammiferi.
- proteggono le cellule dell'organismo dai dannosi attacchi dell'ambiente esterno (per es. radicali liberi)
- svolgono funzioni disintossicanti
- sono coinvolti nel processo della vista
- proteggono la pelle dai danni provocati dai raggi ultravioletti
- aumentano la fertilità negli animali

Oltre a queste attività è stato anche dimostrato come i carotenoidi siano in grado di influenzare la comunicazione intercellulare, di rivestire un ruolo importante nei processi infiammatori inibendo le lipoossigenasi ed infine di potenziare il sistema auto-immune, soprattutto nelle manifestazioni patologiche che lo vedono talvolta notevolmente ridotto nella sua funzionalità. Una loro carenza comporta un aumento del rischio di patologie infiammatorie croniche tra cui l'artrite reumatoide.

Studi epidemiologici hanno evidenziato una forte correlazione fra la carenza di carotenoidi e vari tumori dei tessuti epiteliali: polmone, collo dell'utero, apparato gastrointestinale ed infine la pelle che non è sufficientemente protetta dai radicali liberi e quindi anche dai raggi solari..

E' stato dimostrato come questi cromofori siano in grado di neutralizzare e di impedire la eccessiva formazione di radicali liberi prodotti dal nostro organismo in quantità sempre maggiore a causa della massiccia presenza di inquinanti ambientali, oltre che per la sovraesposizione ai raggi UV.

E' stato inoltre dimostrato come la regolare assunzione di carotenoidi attraverso la dieta incrementi di circa il 50% l'attività foto-protettiva dei filtri solari applicati sulla cute aumentandone il loro fattore di protezione e riducendo la presenza nel sangue di radicali liberi. Esistono, inoltre, numerosi studi sull'effetto protettivo dei carotenoidi. Recentemente sono stati studiati il licopene e l' α -carotene, che sono risultati ancora più attivi verso l'ossigeno singoletto rispetto al β -carotene. Tuttavia, le ultime tendenze in fatto di integratori "pre-sun" sono quelle di utilizzare un mix naturale di carotenoidi contenenti anche componenti minori ed in grado di agire in sinergia fra loro, piuttosto che basarsi solo sui singoli carotenoidi. Inoltre, questo consente anche di aumentare i dosaggi mantenendo una bassa attività provitaminica-A.

Ecco pertanto che, oltre al β -carotene, possiamo trovare integratori con carotenoidi come l' α -carotene ed il γ -carotene, estratti dal frutto della palma da olio (*Elaeis guinensis*), il licopene, estratto dai pomodori, la luteina e la zeaxantina, estratte dai fiori di calendula, o la Polypodium leucotomos, un estratto di felce della America Centrale.

La via biosintetica dei carotenoidi in pianta

La biosintesi dei carotenoidi è regolata durante tutto il ciclo di vita della pianta con cambiamenti dinamici nella composizione in risposta a stimoli ambientali esterni. Esistono

punti chiave regolatori nella via biosintetica che controllano il flusso di metaboliti (Cazzonelli e Pogson, 2010).

I carotenoidi derivano dal pathway del 2-C-metil-D-erythritol 4-phosphate (MEP) nel quale la gliceraldeide 3 fosfato e il piruvato agiscono come substrati iniziali portando alla sintesi del geranilgeranil difosfato (GGPP) (Cordoba *et al.*, 2009, Granjewala *et al.*, 2009) (**Figura 1.4**). La condensazione dei due GGPP mediante la fitoene sintasi (PSY) forma fitoene, il primo carotenoide. PSY è generalmente riconosciuto come il più importante enzima regolatore nel pathway. Trascrizionalmente i geni PSY reagiscono a stress salini, stress idrici, stress dovuti ad una alta intensità luminosa, alla temperatura, al fotoperiodo, e alla regolazione del feedback post trascrizionale.

Mentre esiste un solo gene PSY in *Arabidopsis*, ce ne sono due o più omologhi in pomodoro, riso (*Oryza sativa*), frumento (*Triticum aestivum*) e Mais (*Zea Mais*) (Li *et al.*, 2008, Welsch *et al.*, 2000). La produzione di tutti i *trans*-licopene dal fitoene necessita di un set complesso di quattro reazioni che richiedono la fitoene desaturasi (PDS), Z-carotene isomerasi (ZISO), Z-carotene desaturasi (ZDS) e la carotenoid-isomerasi (CRTISO) così come una fotoisomerizzazione mediata dalla luce (Romer *et al.*, 2000, Breitenbach, Sanndaman 2005 e Dong *et al.*, 2007). La fitoene desaturasi gioca un ruolo limitante nella formazione di 9,15,9'-tris-*cis*-z-carotene poiché l'abbondanza del trascritto è sovraregolata durante la fotomorfogenesi (Welsch *et al.*, 2000).

Non sono ancora noti i ruoli di regolazione di ZDS e Z-ISO nella catalisi dello Z-carotene in tetra-*cis*-licopene, il substrato per CRTISO.

CRTISO ha un ruolo regolatore nel pathway catalizzando le reazioni *cis-trans* (Isaacson *et al.*, 2004, Cazzonelli *et al.*, 2009).

La biosintesi dei carotenoidi si dirama dopo la formazione del licopene per produrre epsilon- e beta-carotenoidi dall'attività enzimatica di due licopene ciclasti (LCY) e questo punto di diramazione ha un ruolo fondamentale nella trasformazione del carotenoide più abbondante, la luteina, in β -carotenoidi. (Cuttriss *et al.*, 2007 e Cazzonelli *et al.*, 2009).

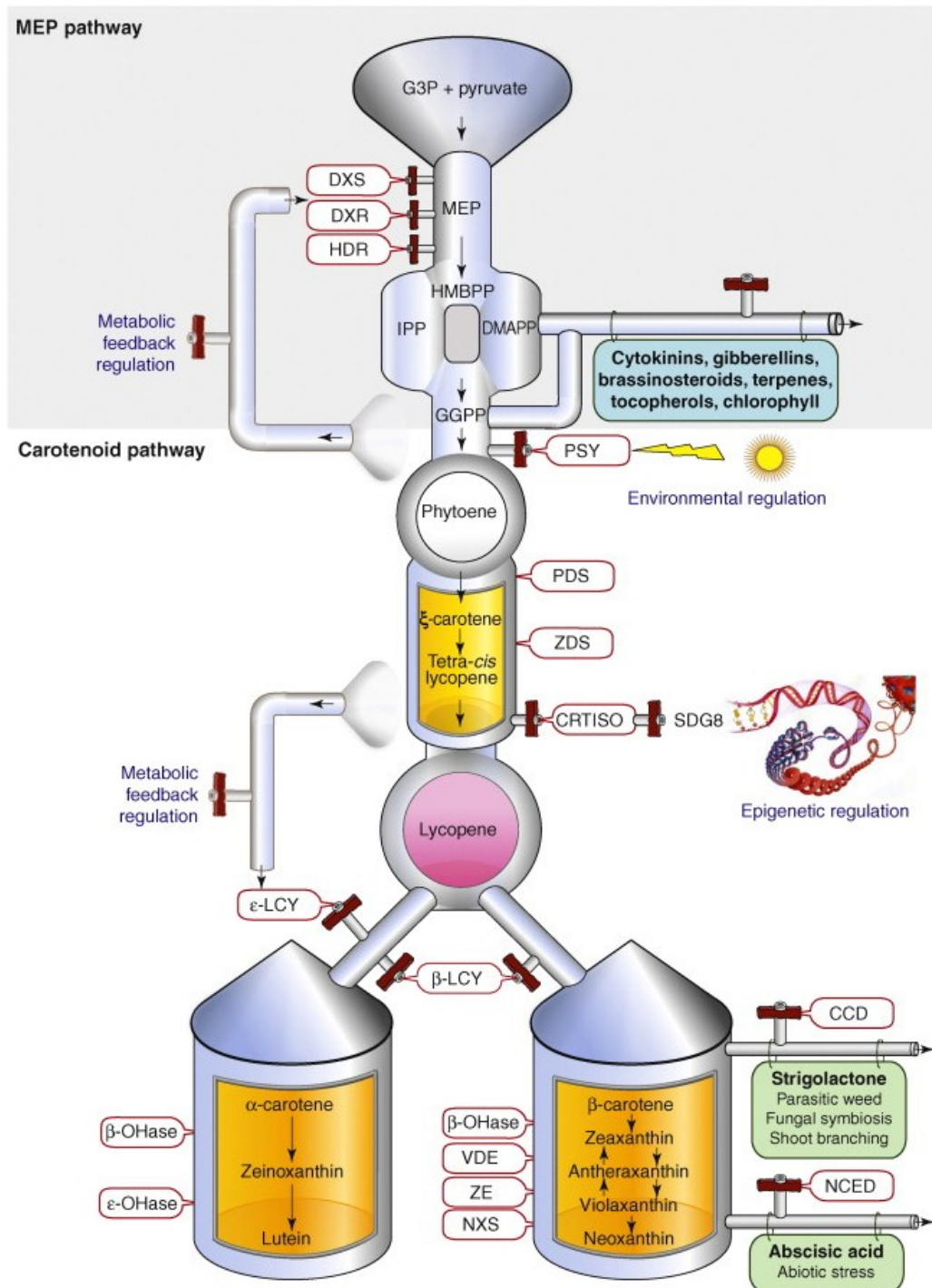


Figura 1.4 Via biosintetica dei carotenoidi

1.6 Ruolo dei metaboliti secondari nella difesa delle piante

Le piante producono un vasto e vario assortimento di composti organici, la maggior parte dei quali è coinvolta nei processi vitali della crescita e dello sviluppo. Essi possono essere divisi in due grandi categorie: i metaboliti primari, indispensabili per le piante, la cui distribuzione è ubiquitaria nel regno vegetale, costituiti essenzialmente da zuccheri, proteine, lipidi e acidi nucleici, e i metaboliti secondari, che invece non sono coinvolti nei processi metabolici basali delle cellule, ma intervengono come mediatori nelle interazioni delle piante con il loro ambiente (Verport e Memelink, 2000). La produzione di questi composti è spesso bassa (meno dell'1% di peso secco) e dipende dallo stadio fisiologico e di sviluppo della pianta (Oksman-Caldentey e Inzè, 2004).

I metaboliti secondari delle piante sono caratterizzati da un'enorme diversità chimica e ogni pianta possiede un suo caratteristico insieme di metaboliti secondari. Basandosi sulla loro origine biosintetica, questi composti possono essere strutturalmente divisi in cinque grandi gruppi: polichetidi, isoprenoidi, alcaloidi, fenilpropanoidi e flavonoidi (Oksman-Caldentey e Inzè, 2004).

I polichetidi sono prodotti tramite la via del mevalonato-acetato; gli isoprenoidi (terpenoidi e steroidi) derivano da un precursore a cinque atomi di carbonio, l'isopentildifosfato (IPP), prodotto dalla classica via del mevalonato oppure dalla nuova via del non-mevalonato; gli alcaloidi sono sintetizzati a partire da vari amminoacidi; i fenilpropanoidi possiedono unità C6-C3 derivanti da amminoacidi aromatici come fenilalanina o tirosina; ed infine, i flavonoidi sono sintetizzati attraverso la combinazione di fenilpropanoidi e polichetidi (Oksman-Caldentey e Inzè, 2004).

I vegetali affidano interamente alla chimica la possibilità di interagire con l'ambiente che li circonda. Determinati composti chimici, prodotti dal loro metabolismo secondario, permettono alle piante di adattarsi a vivere in una notevole diversità di habitat, caratterizzati anche da condizioni estreme (basse o alte temperature, scarsa o eccessiva umidità o salinità del suolo, presenza nel suolo di metalli pesanti o altri inquinanti, ecc), di selezionare le strategie riproduttive più convenienti, di conquistare o difendere un proprio spazio vitale, di difendersi dai predatori (Baladrin *al.*, 2005).

Il ruolo principale di molti metaboliti secondari è di difesa e di molecole segnale. Infatti, questi composti sono stati acquisiti in conseguenza della pressione di selezione che le piante hanno subito durante l'evoluzione (Wink, 2003). Fino ad oggi decine di migliaia di metaboliti secondari delle piante sono stati identificati ed è stato stimato che esistono centinaia di

migliaia di questi composti, ancora non identificati, molti dei quali coinvolti nei meccanismi di difesa contro insetti, microbi, virus e piante competitori. Essi rappresentano una riserva di composti chimici con attività biologiche che possono essere usati, sia in campo agrario, come erbicidi, insetticidi e fungicidi, oppure in campo medico-farmaceutico.

1.7 Le Linee di Introgressione e QTL

Le linee di introgressione (IL) sono un set di linee isogeniche sviluppate attraverso una successione di reincroci, dove ogni linea possiede un singolo frammento cromosomico della specie selvatica in condizione omozigote (definito tramite marcatori molecolari) nel background della specie coltivata *Solanum lycopersicum* cv. M82 (Zamir, 2001). Un'intera collezione di IL ricostituisce l'intero genoma del parentale donatore (**Figura 1.5**). Popolazioni di linee di introgressione sono oggi disponibili per diverse specie selvatiche di pomodoro (Brouwer e St Clair, 2004; Finkers *et al.*, 2007; Frary *et al.*, 2004; Monforte e Tanksley, 2000; Peleman e van der Voort, 2003).

Eshed e Zamir (1994) hanno costruito una popolazione di linee di introgressione derivanti dalla specie selvatica *Solanum pennellii*. La specie desertica a frutti verdi *S. pennellii* è una specie distante da *S. lycopersicum*, avendo evoluto adattamenti unici dal punto di vista morfologico, nel sistema di fecondazione, nella composizione chimica (in particolar modo tra i composti del metabolismo secondario), nelle risposte a stress biotici ed abiotici. Nonostante queste drastiche differenze ecologiche, *S. pennellii* è sessualmente compatibile e produce ibridi fertili quando incrociato con *S. lycopersicum*, rendendolo il parentale donatore della prima popolazione di introgressione.

Le IL oggi disponibili di *S. pennellii* sono 76 ed hanno permesso di dividere il genoma in 107 bin (Pan *et al.*, 2000). Questa popolazione è un potente strumento per gli studi molecolari e genetici, e la sua stabilità genetica ha reso possibile studiare la riproducibilità di caratteri complessi in diverse condizioni ambientali.

Verso la fine degli anni 80, l'avvento dei marcatori molecolari ha consentito per la prima volta di vagliare l'intero genoma alla ricerca dei loci, chiamati QTL (Quantitative Trait Loci), preposti al controllo di un carattere quantitativo. Questi caratteri sono soggetti ad una notevole influenza operata dall'ambiente hanno bassa ereditabilità e sono dipendenti da molti geni.

I QTL caratterizzati da un elevato effetto genico sono spesso indicati come QTL ad effetto maggiore. La crescente disponibilità degli strumenti della genomica e lo sviluppo di materiali vegetali appropriati hanno aperto la strada per la determinazione delle basi molecolari di QTL ad effetto maggiore. La conoscenza delle basi molecolari di un QTL offre indicazioni sulla biologia di caratteri e funzioni fisiologiche e di sviluppo complessi e permette quindi di identificare alleli agronomicamente più validi al *locus* di interesse (Salvi e Tuberosa, 2005).

Le linee di introgressione sono particolarmente utili per la dissezione di caratteri complessi e per consentire l'individuazione ed il mappaggio di QTL di interesse su specifici cromosomi (Lippman *al.*, 2007). In particolare, la popolazione di linee di introgressione di *S. pennellii* è stata utilizzata anche in lavori condotti per l'identificazione dei QTL per l'acido ascorbico, fenoli totali e carotenoidi in pomodoro (Rousseaux et al., 2005; Di Matteo et al., 2010).

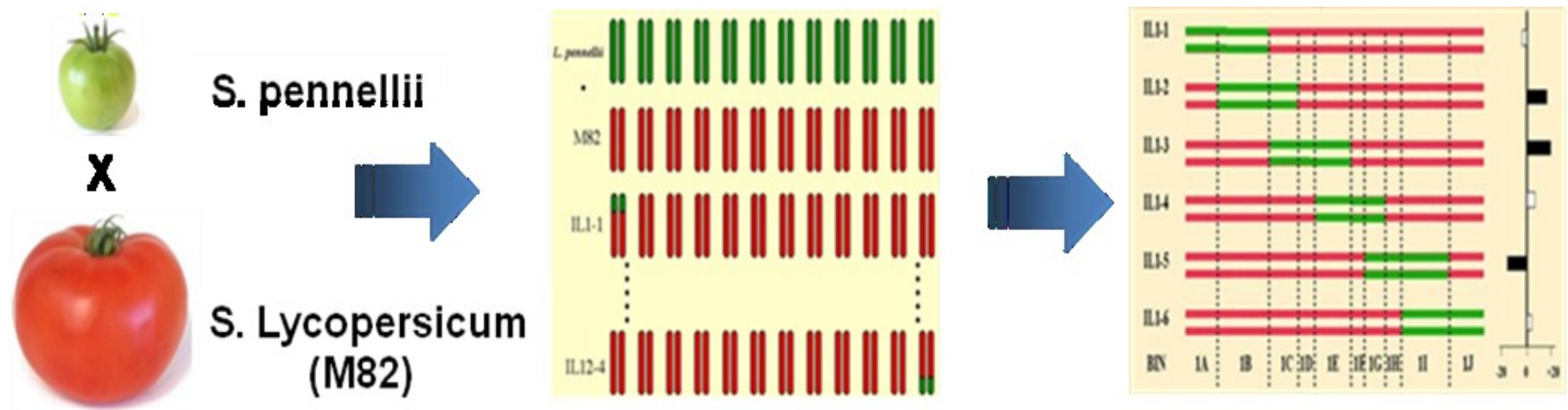


Figura 1.5. Incrocio tra la specie selvatica *Solanum pennellii* e la specie coltivata *Solanum lycopersicum* cv M82 per la costituzione di linee di introgressione.

1.8 I marcatori molecolari in pomodoro

L'uso di marcatori genetici polimorfici per facilitare la selezione durante il lavoro di miglioramento genetico fu proposto per la prima volta all'inizio di questo secolo (Sax, 1923). Un "marcatore genetico" può essere definito come un carattere polimorfico che è associato ad una particolare regione cromosomica. Il marcatore genetico ideale dovrebbe presentare le seguenti caratteristiche: stabilità, non influenzabile dall'ambiente, facile da monitorare, codominante, presente in tutti i tessuti, indipendente da sesso ed età. I marcatori molecolari rispondono bene a tutti questi requisiti, in quanto mettono in evidenza i polimorfismi a livello del DNA.

Un marcatore DNA è tipicamente derivato da una piccola regione di DNA che mostra sequenze polimorfiche fra individui entro la stessa specie o fra individui della stessa cultivar. I marcatori di DNA, che sono neutrali fenotipicamente e teoricamente illimitati in numero, hanno consentito l'esame del genoma in molte specie di piante incluso il pomodoro. Tali marcatori, in genere, non sono generalmente riferibili all'attività di specifici geni, ma si basano direttamente sulla rilevazione di differenze nella sequenza genomica di ogni individuo (dovute ad inserzioni, delezioni, traslocazioni, duplicazioni, mutazioni puntiformi, ecc.).

Fra le specie coltivate il pomodoro è molto ricco nel numero di marcatori molecolari disponibili. Attualmente ci sono più di 2680 RFLP, mappati sui 12 cromosomi, e circa 214.000 EST, derivati da più di 23 librerie cDNA (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/dbEST/). Oltre a tali marcatori ci sono SSR, CAPS, RAPD ed AFLP. Sono stati sviluppati almeno 1292 CAPS e 256 SSR e sono stati mappati sulla mappa genetica del pomodoro ad alta densità (<http://sgn.cornell.edu>).

Tra questi, molto utilizzati sono i marcatori CAPS che individuano una variazione genetica nella lunghezza dei frammenti di DNA rilevata attraverso la digestione tramite enzimi di restrizione dei prodotti di una reazione di PCR ottenuta con primer specifici per una determinata regione genomica (Konieczny e Ausubel, 1993; Jarvis *et al.*, 1994). I primer possono essere disegnati sia sui geni già sequenziati presenti nella banca dati GenBank sia su sequenze di marcatori RFLP associati a geni che si intende analizzare.

Le applicazioni dei marcatori molecolari, nel miglioramento genetico, possono essere diverse. Per esempio è possibile valutare se un individuo di dubbia origine derivi da un determinato incrocio o meno, oppure se sono evidenti le contaminazioni di seme proveniente da autofecondazione, così da discriminare i semi ibridi dai semi self. Il loro ruolo è diventato

sempre più importante non solo nel miglioramento genetico di piante erbacee ma anche arboree, forestali, ornamentali, negli studi di filogenesi, nell'identificazione varietale (fingerprinting), nella realizzazione di mappe genetiche (Andersen e Fairbanks, 1990; Tanksley, 1983; Hospital *al.*, 1992) e nel trasferimento di geni (Vallejos e Tanksley, 1983).

Notevole interesse ha suscitato l'uso dei marcatori molecolari per la selezione assistita (Lande e Thompson, 1990), cioè nella selezione precoce per il carattere di interesse. Essa, infatti, non avviene più a livello del fenotipo (mediante marcatori morfologici) ma a livello del genotipo attraverso l'analisi di marcatori molecolari associati ai geni di interesse (resistenza, maschiosterilità, autoincompatibilità, architettura della pianta, dei fiori, dei frutti, ecc.) (Lefebvre e Chevre, 1995; Powell *al.*, 1996; Staub *al.*, 1996). Tale possibilità, apparsa subito molto affascinante a coloro che operano nel settore del miglioramento genetico, ha portato a parlare di "selezione assistita da marcatori molecolari" (Molecular Assisted Selection, MAS). È necessario, però, assicurarsi che il marcatore abbia una bassissima percentuale di ricombinazione con il carattere oggetto di selezione, cioè che il marcatore ed il gene di interesse siano strettamente associati tra loro (linkage), al fine di permettere di seguire la segregazione del gene saggiando la presenza del marcatore.

Nella selezione assistita l'associazione di un marcatore specifico con il gene o i geni che controllano il carattere da trasferire consente di effettuare uno screening direttamente sul DNA di piantine in fase precoce di sviluppo, senza aspettare la fase fenologica specifica in cui tale carattere si esprime accelerando, quindi, i tempi e riducendo gli spazi necessari al lavoro di selezione. Infatti, dopo aver identificato uno o più marcatori associati al carattere da selezionare, lo screening viene effettuato su piccoli quantitativi di DNA estratto da vari tessuti della pianta, senza determinarne la distruzione. Ciò consente di analizzare contemporaneamente più caratteri e di compiere più cicli di selezione nello stesso anno. Infine, la MAS acquisisce maggior valore quando il carattere è controllato da un gene recessivo, quando esso è poligenico oppure mostra una bassa ereditabilità.

Attualmente la selezione assistita è utilizzata per l'ottenimento di genotipi superiori sia per la resistenza a stress biotici sia per caratteri produttivi o di qualità.

1.9 Scopo della tesi

Il presente progetto di ricerca ha come scopo quello di realizzare il pyramiding di QTL per il controllo di antiossidanti in pomodoro, ciò con l'obiettivo di introdurre tali QTL in linee in avanzata fase di selezione di pomodoro disponibili presso il DISSPAPA e presso il Boyce Thompson Institute di Ithaca NY. In particolare, i QTL considerati in questo studio sono quelli per l'acido ascorbico, per i fenoli, per i solidi solubili totali e per i carotenoidi. Il risultato atteso è la realizzazione di nuovi ibridi che presentano nelle bacche un elevato contenuto in vitamina C, fenoli e carotenoidi.

Per realizzare tale obiettivo sono state seguite, con l'ausilio di marcatori molecolari, l'introgressione di un QTL per il controllo del livello di carotenoidi in una progenie tra due linee di introgressione di *S. pennellii* e la specie coltivata *S. lycopersicum* cultivar M82 (IL2-2 e IL6-3) e le introgressioni di 2 QTL per il controllo di fenoli ed AsA in una progenie tra altre due linee di introgressione (IL7-3 e IL12-4), sempre derivanti da *S. pennellii*. Inoltre è stato avviato anche un programma per la selezione di sub-linee della regione 12-4 con lo scopo di identificare geni candidati alla sintesi di AsA.

2 Materiali e Metodi

2.1 Materiale vegetale

Il materiale vegetale utilizzato nella presente ricerca include cinque linee di introgressione, prodotte tramite reincrocio tra la specie coltivata *Solanum lycopersicum*, cultivar M82, e la specie selvatica *Solanum Pennellii* (Eshed e Zamir, 1994): IL12-4, IL7-3, IL6-3, IL2-2 e IL2-2-1. A queste è stato aggiunto il controllo M82. In particolare, la IL7-3 e la IL12-4 sono state selezionate in quanto esprimono un maggiore contenuto in fenoli totali (Phe) ed acido ascorbico (AsA) nel pericarpo, mentre la IL2-2, la IL6-3 e la IL 2-2-1 sono state selezionate in quanto esprimono un maggior contenuto in carotenoidi totali (Car) nel frutto.

Sono stati eseguiti incroci tra linee di introgressione (IL12-4 X IL7-3 ed IL6-3 X IL2-2) e gli ibridi F1 recanti le due introgressioni allo stato eterozigote sono stati quindi sottoposti ad autofecondazione ottenendo due progenie F2. Nel caso dell'incrocio tra IL12-4 ed IL7-3, la generazione F2, composta da 34 piante di pomodoro, è stata autofecondata ottenendo una generazione F3 che conta 124 piante. La popolazione F2 derivante dall'autofecondazione degli ibridi F1 (IL6-3 X IL2-2) è stata di 100 piante.

I semi delle piante F1 provenienti dall'incrocio tra IL7-3 ed IL12-4 erano già presenti presso il Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e dell'Ambiente (DISSPAPA), sezione di Genetica Vegetale di Portici (NA) e quelli provenienti dell'incrocio tra IL6-3 ed IL2-2 erano presenti presso il BTI della Cornell University di Ithaca (NY).

2.2 Condizioni di crescita delle piante

La germinazione dei semi F2 ed F3 è stata effettuata al buio, in piastre Petri contenenti uno strato di carta Whatman 3MM-CHR (Whatman, Brentford, UK) inumidita. Alla comparsa della prima radichetta, le plantule sono state trasferite in terriccio, disposto in contenitori alveolari di polistirolo (con alveoli di 5 cm di diametro), ed allevate in camera di crescita ad una temperatura costante di 24°C, fotoperiodo di 16 h di luce e di 8 h di buio, 58% di umidità relativa (UR) ed intensità luminosa di $140 \cdot 10^6 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Le piante sono state lasciate in queste condizioni per alcune settimane, dopodiché sono state trasferite in vaso e allevate in serra. Per ogni genotipo sono state allevate 3 o 4 piante. Altri semi della generazione F3 sono stati seminati nei campi sperimentali di Acerra e Battipaglia. Per ogni genotipo sono state allevate 15 piante replica. Le piante IL 2-2-1, le piante F1 derivanti dall'incrocio IL6-3 ed

IL2-2 e quelle derivanti dalla successiva autofecondazione, sono state allevate interamente presso le serre del BTI di Ithaca NY.

Da tutte le piante è stato estratto DNA per effettuare analisi con marcatori molecolari e dalle piante IL2-2-1 è stato estratto l'RNA totale per l'analisi del livello di espressione dei geni coinvolti nel pathway dei carotenoidi. Dalle piante della generazione F1 ed F3 (IL12-4xIL7-3) sono stati raccolti i frutti maturi per effettuare analisi su acido ascorbico, fenoli totali e solidi solubili. I frutti delle piante F2 (IL6-3xIL2-2), e i frutti delle piante IL2-2-1 sono stati raccolti per effettuare analisi sul contenuto in carotenoidi a diversi tempi di maturazione.

2.3 Caratterizzazione fenotipica

2.3.1 Contenuto in solidi solubili totali

I frutti maturi sono stati spremuti e il contenuto dei solidi solubili del succo ricavato è stato misurato con un rifrattometro ottico portatile modello MR90ATC della Trimtec Sistemi. Il contenuto di solidi solubili è stato espresso su una scala di gradi Brix. Per ogni genotipo è stata considerata una media di 10-20 misurazioni.

2.3.2 Estrazione e quantificazione di acido ascorbico (AsA)

Il contenuto di acido ascorbico è stato determinato sui frutti maturi delle piante F1, dei parentali (IL12-4 e IL7-3), delle piante F3 che sono risultate doppio omozigote per le due introgressioni e delle piante ricombinanti. I frutti sono stati raccolti e conservati a -80°C. In seguito sono stati polverizzati con un blender ed è stata effettuata l'estrazione dell'AsA secondo il metodo di Stevens et al., 2006 con alcune modifiche. L'acido ascorbico (AsA) è stato misurato usando una versione modificata del metodo enzimatico descritto da Kampfenkel et al. (1995). Il saggio è basato sulla riduzione del Fe³⁺ a Fe²⁺ per mezzo dell'AsA e sul rilevamento spettrofotometrico del Fe²⁺ complessato con il 2,2'-dipiridilio.

Ad 1 g di campione congelato a -80°C e ridotto in polvere sono stati aggiunti 600 uL di acido tricloroacetico (TCA) al 6% freddo in una eppendorf da 2 mL. I campioni sono stati agitati su vortex per 10 s e lasciati in ghiaccio per 15 min. Sono stati, quindi, centrifugati a 4°C per 15 min a 25000xg. 20 ul di surnatante sono stati utilizzati come campione per saggiare il

contenuto di acido ascorbico.

20 μ L di campione o di standard sono stati distribuiti in tre pozzetti per le tre repliche. 20 μ L di Buffer fosfato (PB) a pH 7,4 e 10 μ L di acqua bd sono stati aggiunti ad ogni campione. Quindi, sono stati aggiunti 80 μ L di Reazione Colorante (RC) ad ogni campione e incubati per 40 min a 37 °C.

La soluzione di Reagente Colorante (RC) è stata ottenuta aggiungendo 2.75 parti di soluzione A ed 1 parte di soluzione B. La composizione delle soluzioni A e B è di seguito riportata:

soluzione A

31% di Acido Ortofosforico

4,6% v/v di TCA

0,6% v/v di cloruro ferrico

soluzione B

4% di 2,2-dipiridyl (disciolto in etanolo al 70%)

Per la lettura spettrofotometrica il campione è stato addizionato con 900 μ L di acqua e sottoposto a lettura a 525 nm utilizzando un Nanophotometer (Implein). La concentrazione di AsA è stata espressa in $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ di peso fresco (PF) utilizzando la curva standard disegnata su un range dinamico da 0 a 100 nmol AsA.

L'equazione ottenuta per l'AsA è $y(\text{Abs}) = 0,0115x - 0,0231$.

Tale retta di taratura è stata costruita utilizzando delle soluzioni standard di acido ascorbico in TCA al 6 %, contenenti rispettivamente 0, 5, 10, 15, 20, 30 e 100 nmol in un volume di 20 μ L.

2.3.3 Estrazione e quantificazione di fenoli (Phe)

La quantità di composti fenolici totali è stata determinata sui frutti maturi delle piante F1, dei parentali (IL12-4 e IL7-3) e delle piante F3 (IL12-4 X IL7-3) che sono risultate doppio omozigoti per le due introgressioni, secondo la procedura di Folin-Ciocalteu's (Singleton e Rossi, 1965). 1 ml di metanolo al 60% è stato aggiunto a 250 mg di tessuto macinato in un tubo da 1.5 ml contenente una biglia metallica. I campioni sono stati omogeneizzati due volte per mezzo di un vortex per un 1 minuto. L'estratto è stato posto su ghiaccio per 3 minuti al buio e poi agitato. L'estratto è stato poi trasferito in un tubo da 15 ml e il volume portato a 5 ml con l'aggiunta di metanolo al 60%. I campioni sono stati quindi centrifugati a 3000 g per 5 minuti. Quindi 62,5 μ L di surnatante sono stati aggiunti a 62,5 μ L di reagente Folin-Ciocalteu's (Sigma) e 250 μ L di acqua deionizzata e incubati per 6 minuti. Dopo l'aggiunta di 625 μ L di

carbonato di sodio al 7.5% e 500 µl di acqua deionizzata, i campioni sono stati incubati per 90 minuti a temperatura ambiente. L'assorbanza è stata misurata a 760 nm. La concentrazione fenolica totale è stata espressa in µg di acido gallico equivalenti*mg⁻¹ di PF, basandosi sulla curva standard dell'acido gallico disegnata su un range dinamico compreso tra 0 e 125. Abs_{760nm} = (0,0234 x µg acido gallico)

2.3.4 Estrazione e quantificazione dei carotenoidi (Car)

La quantità di carotenoidi totali (viene valutato il contenuto di *cis*-Licopene, *trans*-Licopene, Clorofilla A, Clorofilla B, Luteina, β-carotene, γ-carotene, Z-Carotene, Fitofluene, Fitoene) è stata determinata sui frutti in diversi stadi di maturazione della sub IL2-2-1, sui frutti dei parentali (IL6-3 ed IL2-2) e sui frutti delle piante F2 dell'incrocio IL6-3 X IL2-2 risultate doppio omozigoti per le due introgressioni. L'estrazione e la quantificazione dei carotenoidi è stata effettuata mediante il metodo della cromatografia liquida a fase inversa HPLC come descritto da Alba *et al.*, 2005.

2.4 Analisi statistica dei dati fenotipici

I dati chimici raccolti sui campioni sono stati analizzati per mezzo di test parametrici usando SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versione 17. La significatività delle analisi è stata determinata comparando i valori medi dei campioni rispetto ai relativi controlli attraverso una analisi fattoriale della varianza (One-way-ANOVA) con LSD come test post-hoc ad un livello di significatività di 0,05. L'analisi della varianza è stata usata per studiare le differenze per quanto riguarda le concentrazioni di solidi solubili, dell'acido ascorbico, dei composti fenolici e dei carotenoidi. Per studiare le analisi di interazione del genotipo con l'ambiente è stato utilizzato il test post hoc di Duncan.

2.5 Analisi molecolari: sviluppo dei marcatori CAPS

L'utilizzo dei marcatori CAPS prevede tre fasi distinte: estrazione del DNA, amplificazione mediante PCR con primer specifici, e successiva digestione del prodotto amplificato con un

determinato enzima di restrizione.

L'estrazione del DNA genomico è stata effettuata utilizzando il kit commerciale fornito dalla *Invitrogen: PureLink™ Plant Total DNA Purification Kit*. I campioni di tessuto fogliare (100 mg) sono stati prelevati da piante di quattro settimane cresciute in vivo. Le foglie sono state conservate a -80°C, in seguito macinate in azoto liquido, mediante l'utilizzo di mortaio e pestello e su tale polvere è stato applicato il protocollo del Kit menzionato.

Il DNA estratto è stato quantizzato e conservato alla temperatura di -20°C. La quantizzazione è stata fatta mediante elettroforesi su gel d'agarosio allo 0,8-1% disciolto in 1X TAE buffer (10 mM Tris-Cl pH 7,8; 5 mM acetato di sodio, 0,5 mM EDTA; pH 7,8 con acido acetico) e la visualizzazione mediante colorazione del gel con SYBR® Safe DNA gel stain (*Invitrogen*) alla concentrazione di 0,06 µl/ml.

I campioni da visualizzare sul gel sono stati preparati aggiungendo a 2 µl di DNA genomico 2 µl di 1X colorante Dye (0,25% Orange, 0,25% xilene cianolo, 40% saccarosio) e 5 µl di acqua. Il gel è stato visualizzato e fotografato al transilluminatore (Biorad), sottoposto a scansione mediante Typhoon (Amersham) e quantizzato tramite l'analizzatore d'immagine ImageQuant. Un'ulteriore verifica della quantizzazione del DNA, nonché il controllo della qualità degli acidi nucleici, è stata eseguita impiegando lo Spettrofotometro NanoDrop 1000. E' stato controllato che il rapporto A260/A280 fosse pari a 1,8, mentre quello A260/A230 pari a 2,2.

Il DNA è stato amplificato con la reazione a catena della Polimerasi (PCR, Polymerase Chain Reaction) utilizzando circa 50-100 ng di DNA genomico. La miscela, per le reazioni d'amplificazione, è stata preparata in un volume finale di 25 µl, utilizzando:

- primer *forward* 10 pM, 1,0 µl;
- primer *reverse* 10 pM, 1,0 µl;
- Taq DNA polimerasi (5 U/µl) (*Invitrogen*), 0,25 µl;
- Buffer Rxn PCR 10X, 2,5 µl;
- MgCl₂ 50mM, 1,5 µl;
- DNA (diluito 1:30), 50 ng;
- dNTP (miscela di nucleotidi) 10 mM, 1 µl;
- Acqua deionizzata q.b. per raggiungere il volume finale di 25 µl.

La reazione di amplificazione realizzata è stata condotta attraverso un ciclo iniziale di denaturazione del DNA, a 94°C per 3 minuti, seguito da 35 cicli così suddivisi:

- *denaturazione*, a 94°C per 30 secondi;

- *annealing*, a temperatura specifica per ciascun primer per 30 secondi;
- *polimerizzazione*, a 72°C per 30 secondi o per un minuto o anche oltre a seconda della lunghezza attesa dell'amplificato.

Al termine è stato effettuato un ciclo aggiuntivo a 72°C per 7 minuti. Gli amplificati sono stati valutati mediante elettroforesi su gel d'agarosio.

La dimensione dei frammenti è stata comparata con il marcatore di peso molecolare 1Kb *Plus* (Invitrogen). Il gel, infine, è stato visualizzato e fotografato al transilluminatore (Biorad).

Per individuare l'enzima da impiegare nella reazione di digestione è stata eseguito il sequenziamento di ogni amplificato ottenuto dai genotipi parentali. Per tali reazioni è stato utilizzato il BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit basato sul metodo di Sanger.

In un volume finale di 10µl sono state aggiunte le seguenti quantità di reagenti:

- 2,0 µl BigDye Sequencing Buffer 5X
- 10 ng DNA amplificato purificato
- 3,2 pmol *Primer*
- Acqua deionizzata q.b. per raggiungere il volume finale di 10µl.

Il BigDye Sequencing Buffer (una mix contenente deossinucleotidi, dideossinucleotidi ultrapurificati, Taq polimerasi mutante con una migliorata efficienza per l'incorporazione di ddNTPs) è stato usato ad una concentrazione di 1X nel volume. La quantità di DNA varia in base alla lunghezza e alla purezza del frammento amplificato. Per un frammento di 1000 bp sono stati sufficienti 25ng. Per ciascuna reazione è stato utilizzato il *primer* forward e/o il reverse. La miscela ottenuta è stata sottoposta alla reazione di sequenziamento. Le sequenze nucleotidiche sono state elaborate con il software SeqScape (Applied biosystems). Tale software ha consentito di leggere gli elettroferogrammi ottenuti dal sequenziatore filtrando le sequenze ottenute in base a parametri qualitativi. Con lo stesso software sono stati allineati tra loro automaticamente gli elettroforegrammi ottenuti dal sequenziamento, creando una sequenza consenso per ciascun genotipo e allineando le sequenze ottenute a quella riportata dalla banca dati di riferimento del marcatore (www.solgenomics.org). Per ogni sequenza è stato fatto un Blast (Altschul *et al.*, 1990), poi si è proseguito con il loro allineamento con il software Clustalw (Henna *et al.*, 2003) per individuare i polimorfismi. Per una ulteriore verifica, lo stesso lavoro è stato eseguito anche con il software BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) e con quello disponibile on-line dal sito del Sol Genomics Network. Attraverso il programma WEBCUTTER 2.0 (<http://bio.lundberg.gu.se/cutter2/>), sono stati individuati gli enzimi di restrizione utili a

ricercare i polimorfismi tra i parentali.

La reazione di digestione è stata condotta in un volume finale di 15µl, contenente: 5µl di DNA amplificato, 1,5µl di 10X buffer (specifico per ciascun enzima di restrizione), 1U del relativo enzima (0,1µl) e acqua (8,4µl). Tale soluzione è stata incubata alla temperatura appropriata per un periodo di 1,5 - 3 ore. I prodotti di digestione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio all' 1% . I campioni da visualizzare su gel sono stati preparati aggiungendo ai 15 µl di DNA digerito 5µl di 1X colorante Dye. La comparazione è avvenuta con il marcatore di peso molecolare 1Kb *Plus* (Invitrogen). Il gel è stato visualizzato e fotografato al transilluminatore (Biorad), poi sottoposto a scansione mediante Typhoon.

2.6 Estrazione di RNA totale

L'estrazione di RNA da frutto è stata condotta utilizzando RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Ciascun RNA estratto è stato poi sottoposto al trattamento con RQ1 RNase-Free DNase (Promega) in modo da eliminare il DNA eventualmente presente. La reazione (40µl di RNA + 10µl di buffer + 5µl di RQ1 RNase-Free DNase + 2µl di Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor + RNase-free water fino a 100µl) è stata condotta a 37 °C per 40 minuti. L'RNA è stato quindi purificato mediante estrazione fenolo-cloroformio. L'RNA estratto, presente nella fase acquosa è stato prima precipitato con LiCl, poi sottoposto a lavaggi con etanolo 70% ed infine risospeso in H₂O DEPC. 1µl di RNA è stato separato elettroforeticamente su gel di agarosio in 1X TBE e la sua concentrazione determinata allo spettrofotometro (260 nm). L'RNA è stato retrotrascritto a cDNA utilizzando la SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen).

2.7 Analisi Real Time q-PCR

La quantizzazione del livello di espressione dei geni candidati del pathway dei carotenoidi è stata effettuata mediante analisi Real-Time qPCR utilizzando il trascritto 18S come controllo endogeno. L'amplificazione Real-Time qPCR è stata effettuata mediante l'utilizzo della macchina 7900HT Fast Real-Time PCR System e i dati sono stati analizzati con il software SDS 2.2 (Applied Biosystems). L'amplificazione è stata condotta in un volume di reazione di 12,5 µl contenente 0,3 uM di ogni primer, 1X Power SYBR® Green Master Mix (Applied

Biosystems). L'assenza di DNA genomico e la specificità del prodotto di amplificazione sono stati confermati dall'analisi delle curve di dissociazione.

Per ogni campione analizzato sono state utilizzate tre repliche tecniche.

La quantificazione relativa è stata ottenuta con il metodo dei $\Delta\Delta$ Ct. Le coppie di primer sono state validate usando una curva standard su un range di diluizione da $1-10^{-3}$ ($R^2 > 0.98$ e pendenza di circa -3,3).

La significatività statistica delle differenze tra i livelli di espressione dei geni candidati è stata validata mediante l'analisi del test T di Student.

3 Risultati

3.1 Analisi della progenie IL12-4 x IL7-3

3.1.1 Selezione di marcatori polimorfici

Allo scopo di identificare piante doppio omozigoti e ricombinanti nella progenie dell'incrocio tra IL12-4 e IL7-3 è stata effettuata una selezione assistita con marcatori CAPS. La selezione con questi marcatori prevede che il DNA sia amplificato con specifici primer e il prodotto amplificato sia digerito con enzimi che riconoscono siti specifici di taglio nella sequenza e mettono in evidenza polimorfismi presenti nel sito di restrizione. I primer sono stati scelti nella mappa Tomato EXPEN 2000 del Sol Genomics Network e per effettuare l'analisi sono stati scelti dei marcatori localizzati nella parte superiore, mediana e inferiore dell'introgressione specifica dei 2 cromosomi (**Figura 3.1**). In **Tabella 3.1** sono riportate le posizioni in cM dei marcatori, le temperature di annealing dei primer, la dimensione dei frammenti amplificati, l'enzima di restrizione utilizzato e la relativa temperatura di digestione. Per l'analisi della zona superiore dell'introgressione 7-3 è stata scelta la coppia di primer N1 e gli amplificati ottenuti tramite PCR sono stati digeriti con l'enzima *TaqI*. A seguito della digestione si evidenzia polimorfismo tra la IL7-3 e la IL12-4 (utilizzata in questo caso come controllo coltivato), infatti nella suddetta linea il frammento di 400 bp non viene digerito, mentre nella linea IL7-3 la digestione porta alla formazione di due frammenti di 300 bp e 100 bp. Per la regione mediana dell'introgressione 7-3 è stato scelto il marcatore N2 il cui amplificato viene digerito con l'enzima *TaqI* (**Figura 3.2**); in questo caso entrambi i frammenti prodotti con la digestione vengono digeriti e danno, rispettivamente, due frammenti per IL12-4 (500 bp e 150 bp) e tre per IL7-3 (420 bp, 150 bp, 80 bp). Per la zona inferiore della stessa introgressione è stato scelto il marcatore N3, in cui l'amplificato è stato digerito con l'enzima *AluI*: anche in questo caso il frammento PCR non è stato tagliato nella linea IL12-4, mentre ha prodotto due frammenti (230 bp e 140 bp) nella linea IL7-3.

Per la zona superiore dell'introgressione nella regione 4 del cromosoma 12 è stata usata la coppia di primer M1, e gli amplificati prodotti sono stati digeriti con l'enzima *HaeIII*: i frammenti ottenuti nella IL12-4 sono risultati di 200 bp e 300 bp, mentre quelli ottenuti nella linea IL7-3 (utilizzata in questo caso come controllo coltivato) sono risultati di 230 bp, 200 bp e 70 bp. La zona mediana per l'introgressione 12-4 è stata analizzata con due coppie di primer, M2 ed M3, i cui amplificati sono stati digeriti rispettivamente con *ScaI* e *MseI*. Per il marcatore SRE (M2) la posizione è stata dedotta in base alle informazioni provenienti dal

progetto di sequenziamento del genoma del pomodoro. Nel caso del marcatore M2 il frammento PCR di 1200 bp non è digerito nella linea IL12-4, mentre nella linea IL7-3 ha dato due frammenti da 650bp e 550 bp. Nel caso del marcatore M3, il frammento di 450 bp non è stato digerito nella linea IL7-3, mentre ha prodotto due frammenti di 260 bp e 190 bp, rispettivamente, nella linea IL12-4 (**Figura 3.3**). Per la zona inferiore dell'introgressione 12-4 è stato scelto un marcatore SCAR. Questo ha permesso di ottenere uno screening più veloce in quanto attraverso la sola amplificazione con PCR è stato possibile distinguere i due alleli di 1100 bp nella linea IL12-4 e di 1300 bp nella linea IL7-3, dato che le differenze sono dovute ad una delezione di 200 bp nella sequenza della linea IL 7-3 (**Figura 3.4**).

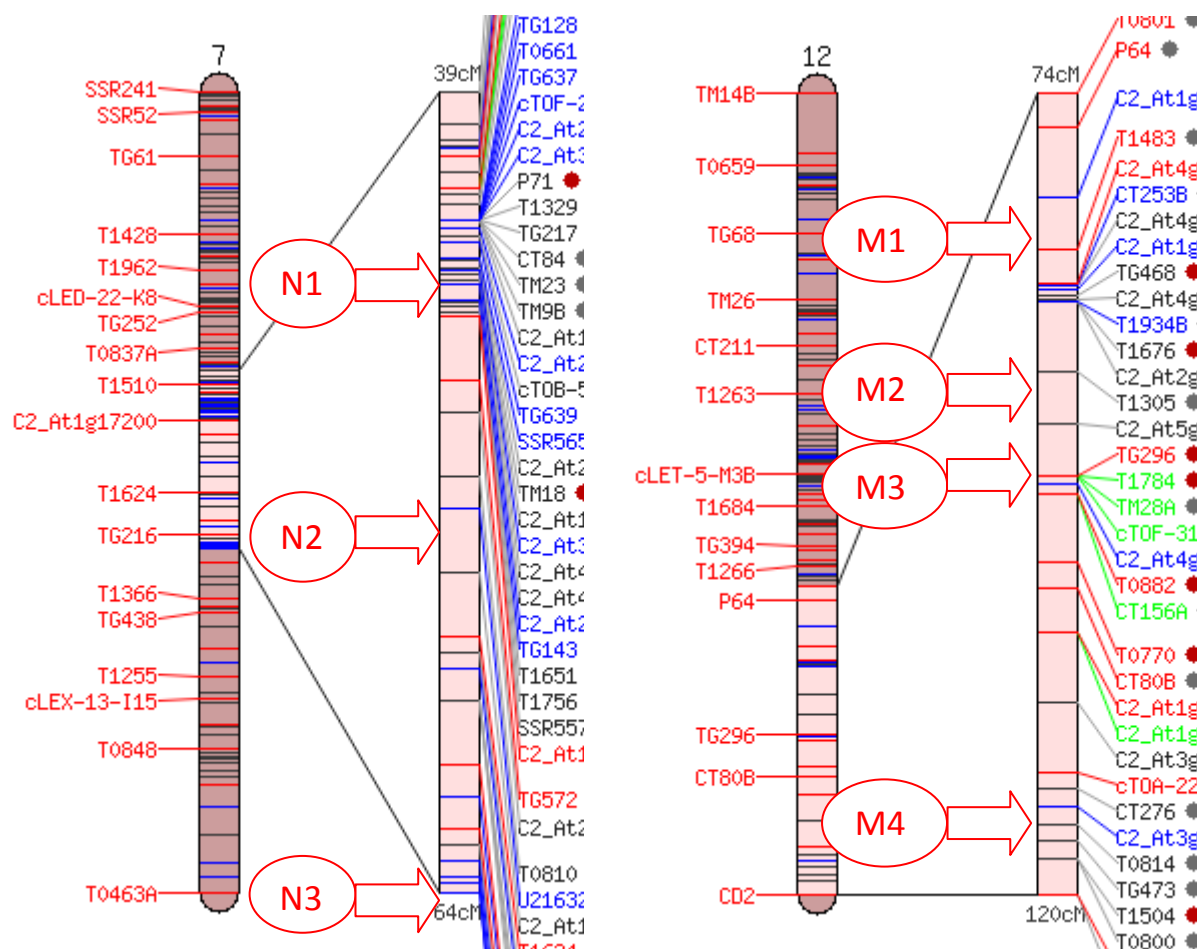


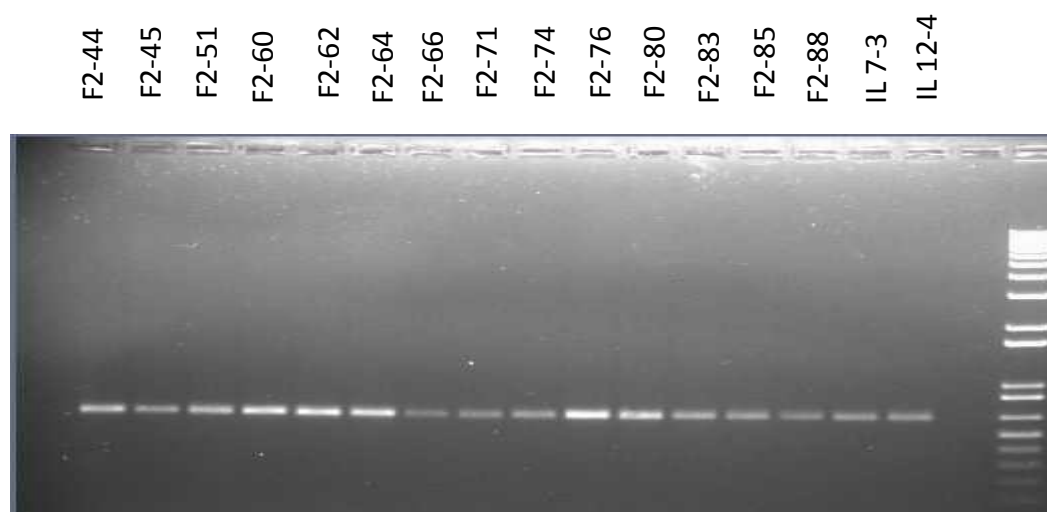
Figura 3.1 Posizione sui cromosomi 7 e 12 dei marcatori utilizzati per l'analisi molecolare delle progenie derivanti dall'incrocio IL12-4xIL7-3 (<http://www.sgn.cornell.edu>).

Tabella 3.1. Marcatori utilizzati per le analisi molecolari delle piante derivanti dall'incrocio IL12-4xIL7-3: sono riportate le posizioni sul cromosoma, le condizioni di amplificazione e digestione, la dimensione dei frammenti polimorfici.

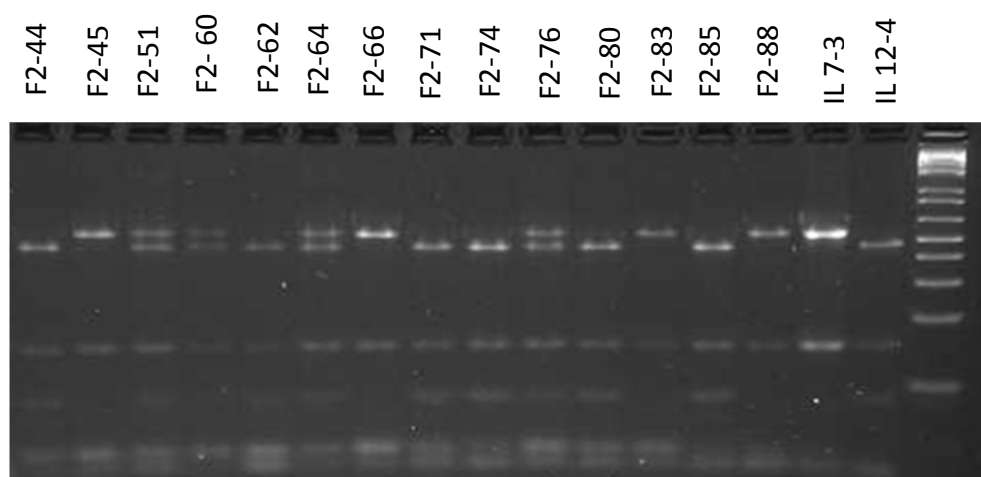
	Marcatore Molecolare	Sequenze dei primer 5'→3'	Codice	Posizione	T annealing	Dimensione amplificato	Enzima di restrizione	T digestione	Prodotti di digestione bp	
				cM	°C	bp		°C	IL12-4	IL7-3
IL 7-3	C2_At2g20830	F: TGACGCGATAAACCTTGAGCAGCAC R: ATAACCTAGCTCCCTCCTTATGGTGTC	N1	43	60°C	400	<i>TaqI</i>	65	400	300+100
	U216327	F: TCACTTCTTGATTTGTGCAGAGG R: AGTGCCCTTATGTAAAGCTTTATCC	N2	52	54°C	650	<i>TaqI</i>	65	500+150	420+150+80
	U220926	F: TTGGTCTATTTGCAATATTTGATGG R: AATCAATATGGCTGTAACAGCAGTTG	N3	63.70	52°C	350	<i>AluI</i>	37	370	230+140
IL12-4	C2_At4g16580	F: TGTTACCTGCCTCATCCTGATAAAG R: ATTTTGAAGACCTCTCCAGAACTTGG	M1	80	53°C	500	<i>Hae III</i>	37	200+300	230+200+70
	SRE	F: GAGAAAAGAGAGGATGTGTGAGG R: GCCAGCAGAGGAACAACAATTG	M2	85	54°C	1200	<i>ScaI</i>	37	1200	650+550
	C2_At5g38530	F: TCGCACAAGCCCACTCTGCTG R: ACTCCTCACCGATAACGGTCTGATG	M3	93	60°C	450	<i>MseI</i>	37	260+190	450
	C2_At3g17000	F: TTCCGATGATTCATGAGCCTTCC R: TCGTGGACCCCTGATTGCAAATTG	M4	115	57°C	1100/1300	-	-	-	-

F: forward

R: reverse



a)



b)

Figura 3.2. Polimorfismi evidenziati con il marcatore CAPS N2 della regione 7-3: a) amplificazione tramite PCR di 14 campioni F2 e dei due parentali IL7-3 e IL12-4; b) digestione degli stessi campioni con l'enzima *TaqI*

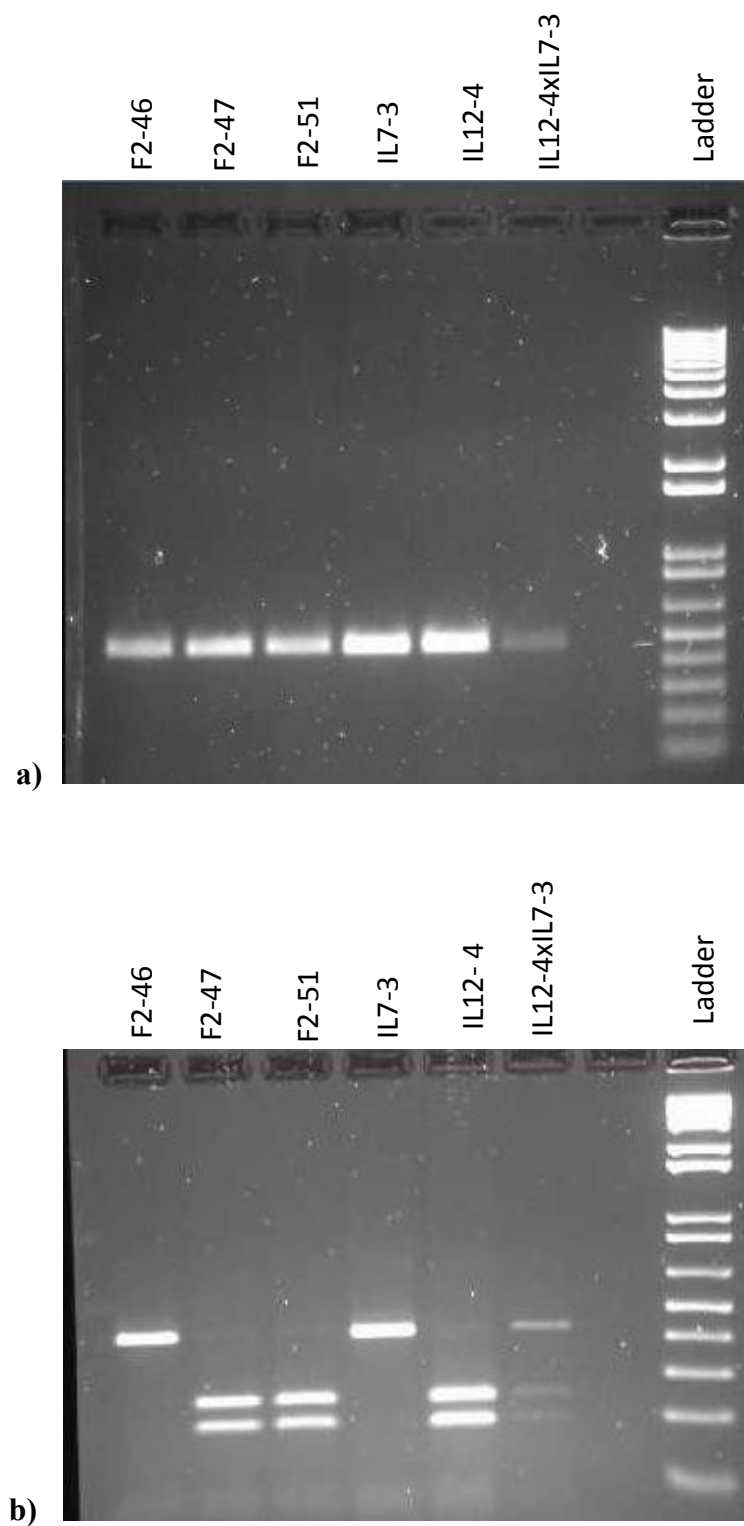


Figura 3.3. Polimorfismi evidenziati con il marcatore CAPS M3 della regione 12-4: a) amplificazione per 3 campioni F2, per i parentali e per l'ibrido F1; b) digestione degli stessi campioni effettuata con l'enzima *MseI*.

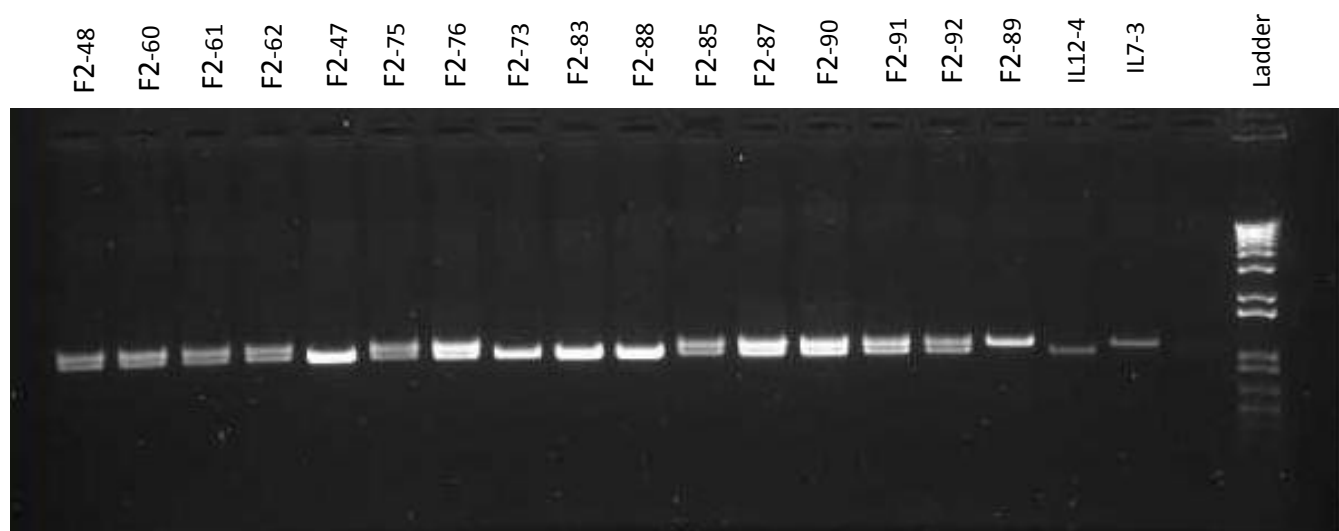


Figura 3.4 Polimorfismi evidenziati in 16 campioni F2 con il marcatore SCAR M4 per la regione 12-4.

3.1.2 Screening molecolare di piante F2

L'analisi molecolare è stata effettuata sul DNA di 34 piante F2 provenienti dall'autofecondazione di ibridi F1 IL12-4xIL7-3. Il DNA è stato amplificato utilizzando i primer specifici per le due introgressioni, e gli amplificati sono stati digeriti con gli specifici enzimi di restrizione come riportato precedentemente. I risultati delle analisi molecolari sono stati visualizzati su gel di agarosio e in base al profilo elettroforetico è stato possibile distinguere per gli specifici loci la condizione omozigote per il genoma selvatico (+/+), quella eterozigote (+/-) e quella omozigote per il genoma coltivato (-/-). In **Tabella 3.2** è riassunta l'analisi molecolare effettuata sulle piante F2.

Considerando la segregazione delle due introgressioni, sono state identificate 4 piante omozigoti per entrambe le introgressioni (F2-45, F2-73, F2-83, F2-88); 1 pianta senza introgressione in posizione 7-3 e omozigote per la 12-4 (F2-41); 1 pianta senza introgressione sia in posizione 7-3 che in posizione 12-4 (F2-46); 9 piante senza introgressione per 7-3 ed eterozigoti per 12-4 (F2-48, F2-49, F2-62, F2-63, F2-71, F2-74, F2-80, F2-87, F2-92); 6 piante eterozigoti per entrambe le introgressioni (F2-60, F2-61, F2-64, F2-67, F2-76, F2-90); 2 piante eterozigoti per 7-3 e omozigoti per 12-4 (F2-51, F2-82); 3 piante omozigoti per 7-3 ed eterozigoti per 12-4 (F2-75, F2-91, F2-93); 1 pianta omozigote per 7-3 e senza introgressione per la 12-4 (F2-89); 3 piante eterozigoti per la 7-3 e senza introgressione per la 12-4 (F2-72, F2-77, F2-84). Inoltre, sono state individuate 4 piante ricombinanti per l'introgressione, cioè piante in cui il frammento introgresso è di dimensioni inferiori rispetto a quello dei parentali IL7-3 e IL12-4. Infatti i campioni F2-44 e F2-47 risultano omozigoti per la regione 12-4, e per la regione 7-3 risultano senza introgressione nei loci dei marcatori N1 ed N2 ed eterozigoti al locus N3. Il campione F2-85 risulta eterozigote solo al locus M4, mentre non è presente l'introgressione per tutti gli altri loci analizzati sia della regione 12-4 che della regione 7-3. Il campione F2-66 risulta omozigote a tutti i loci analizzati della regione 7-3, mentre nella regione 12-4 è risultato non introgresso al locus M1 ed eterozigote ai loci M2 ed M4.

Dai frutti delle piante F2 sono stati prelevati i semi per la generazione F3. Le piante F3 ottenute sono state trapiantate in due campi sperimentali (Acerra e Battipaglia) e presso la serra del DISSPAPA (Portici), al fine di ottenere prove sperimentali in diversi ambienti di coltivazione.

Tabella 3.2 Analisi effettuata con i marcatori molecolari sul DNA di piante F2 derivanti dall'incrocio IL12-4xIL7-3. +/+ : condizione omozigote per genoma selvatico; +/-: condizione eterozigote; -/-: condizione omozigote per il genoma coltivato.

Campioni	Marcatori per IL7-3			Marcatori per IL12-4		
	N1	N2	N3	M1	M2	M4
F2-41	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+
F2-44	-/-	-/-	+/-	+/+	+/+	+/+
F2-45	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
F2-46	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
F2-47	-/-	-/-	+/-	+/+	+/+	+/+
F2-48	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-
F2-49	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-
F2-51	+/-	+/-	+/-	+/+	+/+	+/+
F2-60	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
F2-61	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
F2-62	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-
F2-63	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-
F2-64	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
F2-66	+/+	+/+	+/+	-/-	+/-	+/-
F2-67	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
F2-71	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-
F2-72	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-
F2-73	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
F2-74	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-
F2-75	+/+	+/+	+/+	+/-	+/-	+/-
F2-76	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
F2-77	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-
F2-80	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-
F2-82	+/-	+/-	+/-	+/+	+/+	+/+
F2-83	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
F2-84	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-
F2-85	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-
F2-87	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-
F2-88	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
F2-89	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-
F2-90	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
F2-91	+/+	+/+	+/+	+/-	+/-	+/-
F2-92	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-
F2-93	+/+	+/+	+/+	+/-	+/-	+/-

3.1.3 Screening molecolare di piante F3 allevate in serra

A seguito dell'analisi molecolare delle piante F2, sono stati selezionati 20 genotipi considerati più interessanti. Sono stati seminati i semi delle 4 piante omozigoti per entrambe le introgressioni (F2-45, F2-73, F2-83, F2-88), i semi delle 8 piante eterozigoti per l'introgressione 12-4 e senza introgressione nella regione 7-3 (F2-48, F2-49, F2-62, F2-63, F2-71, F2-80, F2-87, F2-92), 1 delle 3 piante eterozigoti per l'introgressione 7-3 e senza introgressione nella regione 12-4 (F2-77), più 3 campioni presi a caso (F2-41, F2-47, F2-85). Infine sono stati selezionati i semi dei 4 genotipi ricombinanti (F2-44, F2-47, F2-66, F2-85). Per ogni genotipo F2 sono state allevate 3 o 4 piante F3. Nell'analisi molecolare sono stati provati solo alcuni marcatori per genotipo, per verificare le condizioni dei loci omozigoti, eterozigoti e di quelli ricombinanti. In **Tabella 3.3** sono riassunti i risultati dell'analisi molecolare.

Considerando la segregazione delle due introgressioni, sono state confermate le 4 piante omozigoti per entrambe le introgressioni (F2-45, F2-73, F2-83, F2-88); sono state identificate 11 piante senza introgressione in posizione 7-3 e omozigoti per la 12-4 (F3-41A, F3-41B, F3-41C, F3-44A, F3-44C, F3-44D, F3-48A, F3-48D, F3-63A, F3-63C, F3-80C); 10 piante senza introgressione sia in posizione 7-3 sia in posizione 12-4 (F3-48H, F3-49C, F3-62A, F3-63E, F3-71A, F3-71C, F3-80A, F3-80B, F3-85C, F3-87C); 12 piante senza introgressione per 7-3 ed eterozigoti per 12-4 (F3-48C, F3-49A, F3-49B, F3-62B, F3-62C, F3-63B, F3-63D, F3-71B, F3-74C, F3-87A, F3-87B, F3-87C); 4 piante omozigoti per 7-3 e senza introgressione per la 12-4 (F3-66A, F3-89A, F3-89B, F3-89C); 2 piante eterozigoti per la 7-3 e senza introgressione per la 12-4 (F3-77A, F3-77B) e 7 piante ricombinanti con la ricombinazione in eterozigosi (F3-47A, F3-47B, F3-47C, F3-48B, F3-66H, F3-85A, F3-85B). Tra le progenie delle piante F2 eterozigoti per la sola introgressione IL12-4 si è osservata sempre segregazione della regione 12-4. Sono state individuate anche 3 piante con eventi di ricombinazione in omozigosi (F3-66B, F3-66C, F3-66D) in cui manca il frammento selvatico in corrispondenza del locus M2.

Tabella 3.3 Analisi effettuata con i marcatori molecolari sul DNA di piante F3 allevate in serra. Nella 2^a e 3^a colonna viene riportata la condizione omo/eterozigote nelle regioni 7-3 e 12-4 delle piante F₂ che hanno generato le progenie F₃. L'asterisco indica la presenza di un evento di ricombinazione nella F₂. +/+ : condizione omozigote per genoma selvatico; +/-: condizione eterozigote; -/-: condizione omozigote per il genoma coltivato.

CAMPIONI F3	Condizione nella F2		Marcatori IL7-3			Marcatori IL12-4	
	7-3	12-4	N1	N2	N3	M2	M4
F3-41 A	-/-	+/+	-/-				+/+
F3-41 B			-/-				+/+
F3-41 C			-/-				+/+
F3-44*A	+/-	+/+	-/-		-/-		+/+
F3-44*C			-/-		-/-		+/+
F3-44*D			-/-		-/-		+/+
F3-45 A	+/+	+/+		+/+			+/+
F3-45 B				+/+			+/+
F3-45 C				+/+			+/+
F3-45 D				+/+			+/+
F3-47*A	+/-	+/+	-/-	-/-	+/-		+/+
F3-47*B			-/-	-/-	+/-		+/+
F3-47*C			-/-	-/-	+/-		+/+
F3-48 A	-/-	+/-	-/-				+/+
F3-48 B			-/-			+/-	+/+
F3-48 C			-/-	-/-		+/-	+/-
F3-48 D			-/-			+/+	+/+
F3-48 H			-/-	-/-		-/-	-/-
F3-49 A	-/-	+/-	-/-	-/-		+/-	+/-
F3-49 B			-/-	-/-		+/-	+/-
F3-49 C			-/-	-/-			-/-
F3-62 A	-/-	+/-	-/-	-/-			-/-
F3-62 B			-/-	-/-			+/-
F3-62 C			-/-	-/-			+/-
F3-63 A	-/-	+/-	-/-	-/-		+/+	+/+
F3-63 B			-/-	-/-		+/-	+/-
F3-63 C			-/-			+/+	+/+
F3-63 D			-/-	-/-		+/-	+/-
F3-63 E			-/-	-/-		-/-	-/-
F3-66*A	+/+	+/-	+/+	+/+		-/-	-/-
F3-66*B			+/+	+/+		-/-	+/+
F3-66*C			+/+	+/+		-/-	+/+

F3-66 D			+/+	+/+		-/-	+/+
F3-66 H			+/+	+/+		-/-	+/+
F3-71 A	-/-	+/-	-/-	-/-		-/-	-/-
F3-71 B			-/-	-/-		+/-	+/-
F3-71 C			-/-	-/-		-/-	-/-
F3-73 A	+/+	+/+		+/+			+/+
F3-73 B				+/+			+/+
F3-73 C				+/+			+/+
F3-74*A	-/-	+/-					+/+
F3-74*B							+/+
F3-74*C			-/-	-/-		+/-	+/-
F3-77 A	+/-	-/-		+/-		-/-	-/-
F3-77 B				+/-		-/-	-/-
F3-80 A	-/-	+/-	-/-	-/-		-/-	-/-
F3-80 B			-/-	-/-			-/-
F3-80 C			-/-			+/+	+/+
F3-83 A	+/+	+/+		+/+			+/+
F3-83 B				+/+			+/+
F3-83 C				+/+			+/+
F3-85*A	-/-	+/-	-/-	-/-		-/-	+/-
F3-85*B			-/-	-/-		-/-	+/-
F3-85*C			-/-	-/-		-/-	-/-
F3-87 A	-/-	+/-	-/-	-/-		+/-	+/-
F3-87 B			-/-	-/-		+/-	+/-
F3-87 C			-/-	-/-		-/-	-/-
F3-87 D			-/-	-/-		+/-	+/-
F3-88 A	+/+	+/+		+/+			+/+
F3-88 B				+/+			+/+
F3-88 C				+/+			+/+
F3-89 A	+/+	-/-		+/+		-/-	-/-
F3-89 B				+/+		-/-	-/-
F3-89 C				+/+		-/-	-/-

3.1.4 Screening molecolare di piante F3 allevate in campo

I semi della F2 sono stati utilizzati per allevare anche piante in un campo sperimentale ad Acerra. Sono stati selezionati 14 genotipi della F2, di cui 8 eterozigoti per la regione 12-4 (F2-48, F2-49, F2-62, F2-66, F2-80, F2-85, A-87, F2-92,), 2 eterozigoti per la regione 7-3 (F2-77, F2-82) e 4 omozigoti per entrambe le introgressioni (F2-45, F2-73, F2-83, F2-88). Questi ultimi 4 genotipi sono stati allevati anche in un campo sperimentale a Battipaglia. In **Tabella 3.4** sono riassunti i dati dello screening della selezione assistita da marcatori molecolari. In un primo momento l'analisi è stata portata avanti utilizzando un solo marcatore per l'introgressione 7-3 e uno per la 12-4. In questo ultimo caso è stato scelto il marcatore SCAR M4 che ha permesso di distinguere la condizione omozigote/eterozigote/non introgresso senza eseguire la digestione. L'utilizzo di un solo marcatore è stata utile per definire il tipo di segregazione, permettendoci così di scartare i genotipi che presentavano una condizione eterozigote. In seguito sono stati scelti altri marcatori per definire la situazione dell'intera introgressione solo in quei genotipi risultati omozigoti (+/+ o -/-) con il marcatore M4 su un totale di 124 piante analizzate. Sono state individuate 25 piante senza introgressione per entrambi i cromosomi (F3-48A5, F3-48C3, F3-49C1, F3-49C2, F3-62B4, F3-62C2, F3-77B1, F3-77B5, F3-80B5, F3-80C2, F3-80C3, F3-80C5, F3-85B3, F3-85C2, F3-85C5, F3-87A1, F3-87A2, F3-87A3, F3-87B3, F3-87C1, F3-92A2, F3-92B1, F3-92B2, F3-92B3, F3-92B5), 13 piante omozigoti per 12-4 e non introgresse al segmento 3 del cromosoma 7 (F3-48A2, F3-48A4, F3-48B1, F3-48B3, F3-48B4; F3-62A3, F3-62B1, F3-62B3; F3-80A1, F3-80B4; F3-87B4, F3-87B5, F3-87C2), 3 piante omozigoti per la 7-3 e senza introgressione al segmento 4 del cromosoma 12 (F3-77C1, F3-77C2, F3-77C3), 4 piante in condizione omozigote per entrambe le introgressioni (F3-45, F3-73, F3-83, F3-88), 9 piante eterozigoti per 7-3 e non introgresse per 12-4 (F3-77A1, F3-77A3, F3-77A4, F3-77A5, F3-77B2, F3-77B3, F3-77B4, F3-77C4, F3-77C5), 1 pianta eterozigote 7-3 ed omozigote 12-4 (F3-82 A4), 4 piante ricombinanti con la ricombinazione in omozigosi (A7-66A1, A7-85A1, A7-85C1, A7-85C4) e 20 piante ricombinanti con la ricombinazione in eterozigosi (F3-48A1, F3-49A3, F3-49 B4, F3-49B5, F3-62C3, F3-66A2, F3-66A3, F3-66A4, F3-66A5, F3-77A2, F3-85A2, F3-85A3, F3-85A4, F3-85B1, F3-85B2, F3-85B4, F3-85B5, F3-85C3, F3-87A4, F3-92B4). Sono state considerate come ricombinanti solo quelle piante che mostravano una condizione omozigote o non introgressa in un locus e situazione inversa in tutti gli altri loci. Ad esempio i campioni F3-85A1, F3-85C1 e F3-85C4 risultano omozigoti al locus M4,

mentre non presentano l'introggressione del frammento selvatico nella restante parte dell'introggressione analizzata. Il campione A7-66A1 risulta non introgresso ai loci M1 ed M2 ed omozigote ai loci M3 ed M4. Le restanti 41 piante sono risultate non introgresse per 7-3 ed eterozigoti per 12-4.

Tabella 3.4 Analisi effettuata con i marcatori molecolari sul DNA di piante F₃ allevate in campo. Nella 2^a e 3^a colonna viene riportata la condizione omo/eterozigote nelle regioni 7-3 e 12-4 delle piante F₂ che hanno generato le progenie F₃. L'asterisco indica la presenza di un evento di ricombinazione nella pianta F₂. +/+ : condizione omozigote per genoma selvatico; +/-: condizione eterozigote; -/-: condizione omozigote per il genoma coltivato.

Campioni Acerra F3	Condizioni nella F2		Marcatori per IL7-3			Marcatori per IL12-4			
	IL 7-3	IL12-4	N1	N2	N3	M1	M2	M3	M4
F3-45 A1	+/+	+/+		+/+			+/+		+/+
F3-45 A2	+/+	+/+		+/+			+/+		+/+
F3-48 A1	-/-	+/-	-/-			+/-	+/-	+/+	+/+
F3-48 A2			-/-			+/+	+/+	+/+	+/+
F3-48 A3			-/-			+/-		+/-	+/-
F3-48 A4			-/-			+/+	+/+		+/+
F3-48 A5			-/-			-/-	-/-		-/-
F3-48 B1			-/-			+/+	+/+	+/+	+/+
F3-48 B2			-/-			+/-		+/-	+/-
F3-48 B3			-/-			+/+	+/+	+/+	+/+
F3-48 B4			-/-			+/+	+/+	+/+	+/+
F3-48 B5			-/-			+/-		+/-	+/-
F3-48 C1			-/-			+/-	+/-	+/-	+/-
F3-48 C2			-/-			+/-	+/-	+/-	+/-
F3-48 C3			-/-			-/-	-/-		-/-
F3-48 C4			-/-			+/-	+/-	+/-	+/-
F3-48 C5			-/-			+/-	+/-	+/-	+/-
F3-49 A1	-/-	+/-	-/-				+/-		+/-
F3-49 A2			-/-				+/-		+/-
F3-49 A3			-/-				-/-		+/-
F3-49 A4			-/-						+/-
F3-49 B2			-/-				+/-		+/-
F3-49 B3			-/-				+/-		+/-
F3-49 B4			-/-				+/-		+/+
F3-49 B5			-/-				+/-		+/+
F3-49 C1			-/-			-/-	-/-		-/-
F3-49 C2			-/-			-/-	-/-		-/-
F3-49 C3			-/-				+/-		+/-
F3-49 C4			-/-				+/-		+/-
F3-49 C5			-/-				+/-		+/-
F3-62 A1	-/-	+/-	-/-				+/-		+/-
F3-62 A2			-/-				+/-		+/-

F3-62 A3			-/-			+/+	+/+		+/+
F3-62 A4			-/-						+/-
F3-62 A5			-/-						+/-
F3-62 B1			-/-			+/+	+/+		+/+
F3-62 B2			-/-				+/-		+/-
F3-62 B3			-/-			+/+	+/+		+/+
F3-62 B4			-/-			-/-	-/-		-/-
F3-62 B5			-/-				+/-		+/-
F3-62 C1			-/-				+/-		+/-
F3-62 C2			-/-			-/-	-/-		-/-
F3-62 C3			-/-				+/+		+/-
F3-62 C4			-/-				+/-		+/-
F3-62 C5			-/-				+/-		+/-
F3-66 A1	+/+	+/-		+/+		-/-	-/-	+/+	+/+
F3-66 A2				+/+			-/-		+/-
F3-66 A3				+/+			-/-		+/-
F3-66 A4				+/+			-/-		+/-
F3-66 A5				+/+			-/-		+/-
F3-73 A1	+/+	+/+		+/+			+/+		+/+
F3-73 A2	+/+	+/+		+/+			+/+		+/+
F3-77 A1	+/-	-/-	+/-						-/-
F3-77 A2			-/-	+/-	+/-				-/-
F3-77 A3			+/-						-/-
F3-77 A4				+/-					-/-
F3-77 A5				+/-					-/-
F3-77 B1			-/-	-/-	-/-				-/-
F3-77 B2				+/-					-/-
F3-77 B3				+/-					-/-
F3-77 B4				+/-					-/-
F3-77 B5			-/-	-/-	-/-				-/-
F3-77 C1			+/+	+/+	+/+				-/-
F3-77 C2			+/+	+/+	+/+				-/-
F3-77 C3			+/+	+/+	+/+				-/-
F3-77 C4				+/-					-/-
F3-77 C5				+/-					-/-
F3-80 A1	-/-	+/-	-/-			+/+	+/+		+/+
F3-80 A2			-/-				+/-		+/-
F3-80 A3			-/-				+/-		+/-
F3-80 B1			-/-				+/-		
F3-80 B2			-/-				+/-		
F3-80 B3			-/-				+/-		
F3-80 B4			-/-			+/+	+/+	+/+	+/+
F3-80 B5			-/-			-/-	-/-	-/-	-/-
F3-80 C1			-/-				+/-		
F3-80 C2			-/-			-/-	-/-		-/-
F3-80 C3			-/-			-/-	-/-	-/-	-/-
F3-80 C4			-/-				+/-		
F3-80 C5			-/-			-/-	-/-	-/-	-/-
F3-83 A1	+/+	+/+		+/+			+/+		+/+
F3-83 A2	+/+	+/+		+/+			+/+		+/+
F3-82 A4	+/-	+/+		+/-			+/+		+/+

F3-85 A1*	-/-	+/-	-/-			-/-	-/-	-/-	+/+
F3-85 A2*			-/-				-/-	-/-	+/-
F3-85 A3*			-/-				-/-		+/-
F3-85 A4*			-/-				-/-	-/-	+/-
F3-85 B1*			-/-				-/-	-/-	+/-
F3-85 B2*			-/-				-/-	-/-	+/-
F3-85 B3*			-/-			-/-	-/-		-/-
F3-85 B4*			-/-				-/-	-/-	+/-
F3-85 B5*			-/-				-/-	-/-	+/-
F3-85 C1*			-/-			-/-	-/-	-/-	+/+
F3-85 C2*			-/-			-/-	-/-		-/-
F3-85 C3*			-/-				-/-	-/-	+/-
F3-85 C4*			-/-			-/-	-/-	-/-	+/+
F3-85 C5*			-/-			-/-	-/-		-/-
F3-87 A1	-/-	+/-	-/-			-/-	-/-		-/-
F3-87 A2			-/-			-/-	-/-		-/-
F3-87 A3			-/-			-/-	-/-		-/-
F3-87 A4			-/-						+/-
F3-87 B2			-/-				+/+		
F3-87 B3			-/-				-/-		-/-
F3-87 B4			-/-				+/+		+/+
F3-87 B5			-/-				+/+		+/+
F3-87 C1			-/-				-/-		-/-
F3-87 C2			-/-				+/+		+/+
F3-87 C3			-/-				+/+		
F3-87 C4			-/-				+/+		
F3-87 C5			-/-				+/+		
F3-88 A1	+/+	+/+		+/+			+/+		+/+
F3-88 A2	+/+	+/+		+/+			+/+		+/+
F3-92 A1	-/-	+/-	-/-				+/+		+/-
F3-92 A2			-/-			-/-	-/-		-/-
F3-92 B1			-/-			-/-	-/-		-/-
F3-92 B2			-/-			-/-	-/-		-/-
F3-92 B3			-/-			-/-	-/-		-/-
F3-92 B4			-/-				+/+		+/-
F3-92 B5			-/-			-/-	-/-		-/-
F3-92 C1			-/-				+/+		+/+
F3-92 C2			-/-				+/+		+/+
F3-92 C3			-/-				+/+		+/+
F3-92 C4			-/-				+/+		+/+
F3-92 C5			-/-				+/+		+/+

3.1.5 Mappaggio dei geni dell'introgressione IL12-4

Per poter definire meglio le regioni ricombinanti delle sub linee individuate tramite lo screening molecolare con i marcatori selezionati, è stato condotto uno studio bioinformatico. Grazie alle attuali risorse genetiche e genomiche per il pomodoro, in particolare la disponibilità in banca dati dell'intero genoma, è stato possibile identificare e mappare i geni contenuti nell'introgressione 4 del cromosoma 12 che racchiude un'area di 46,00 cM a partire dalla posizione di 74 cM fino a quella a 120 cM. Questo ha permesso di selezionare i geni potenzialmente correlati al pathway dell'acido ascorbico e di isolare cluster di geni fisicamente associati. I cluster sono suddivisi uniformemente all'interno dell'introgressione e la distanza tra i blocchi è risultata variare tra 200 e 500 Kb. In particolare sono state valutate le posizioni di 5 blocchi di geni risultati particolarmente interessanti rispetto alle posizioni dei marcatori utilizzati nello screening molecolare. **(Figura 3.5).**

Il primo blocco è stato mappato all'altezza di 85 cM ed è compreso tra il marcatore M1 ed M2 e include alcuni fattori di trascrizione, una fosfatasi e il gene SRE 1b (marcatore M2). Il secondo blocco mappa a 85,10 cM e comprende fattori di trascrizione zinc finger, alcuni geni per proteine vacuolari, espansine, glutatione transferasi e pectinesterasi. Tra il marcatore M2 e il marcatore M3 è inserito anche un gene codificante per una fosfofruttochinasi.

I restanti tre blocchi sono compresi tra il marcatore M3 ed M4. In particolare, il terzo blocco, mappato a 93 cM sul cromosoma 12, comprende un cluster di diversi geni codificanti per triptofano sintasi. Il quarto blocco, invece, include geni che codificano per una mio-inositolo ossigenasi e una pectin metil-esterasi. L'ultimo blocco mappato a 113 cM racchiude geni del pathway dell'acido ascorbico come l'aldeide deidrogenasi, fattori di trascrizione MYB e geni del metabolismo degli zuccheri (ATP citrato liasi e inibitori di invertasi).

I ricombinanti individuati nel presente lavoro hanno mostrato attraverso lo screening molecolare di avere diverse dimensioni dell'introgressione 12-4. Il ricombinante F3-66A1 presenta l'allele coltivato per i marcatori M1 ed M2, mentre presenta l'allele selvatico per i marcatori M3 ed M4 quindi comprende il terzo, quarto e quinto blocco di geni identificati. Gli altri tre genotipi ricombinanti: F3-85A1, F3-85C1 e F3-85C4 hanno mostrato una ridotta introgressione del genoma selvatico, ristretta al marcatore M4 nella zona terminale del segmento introgresso e di conseguenza, non comprendono alcuno dei blocchi sopra descritti.

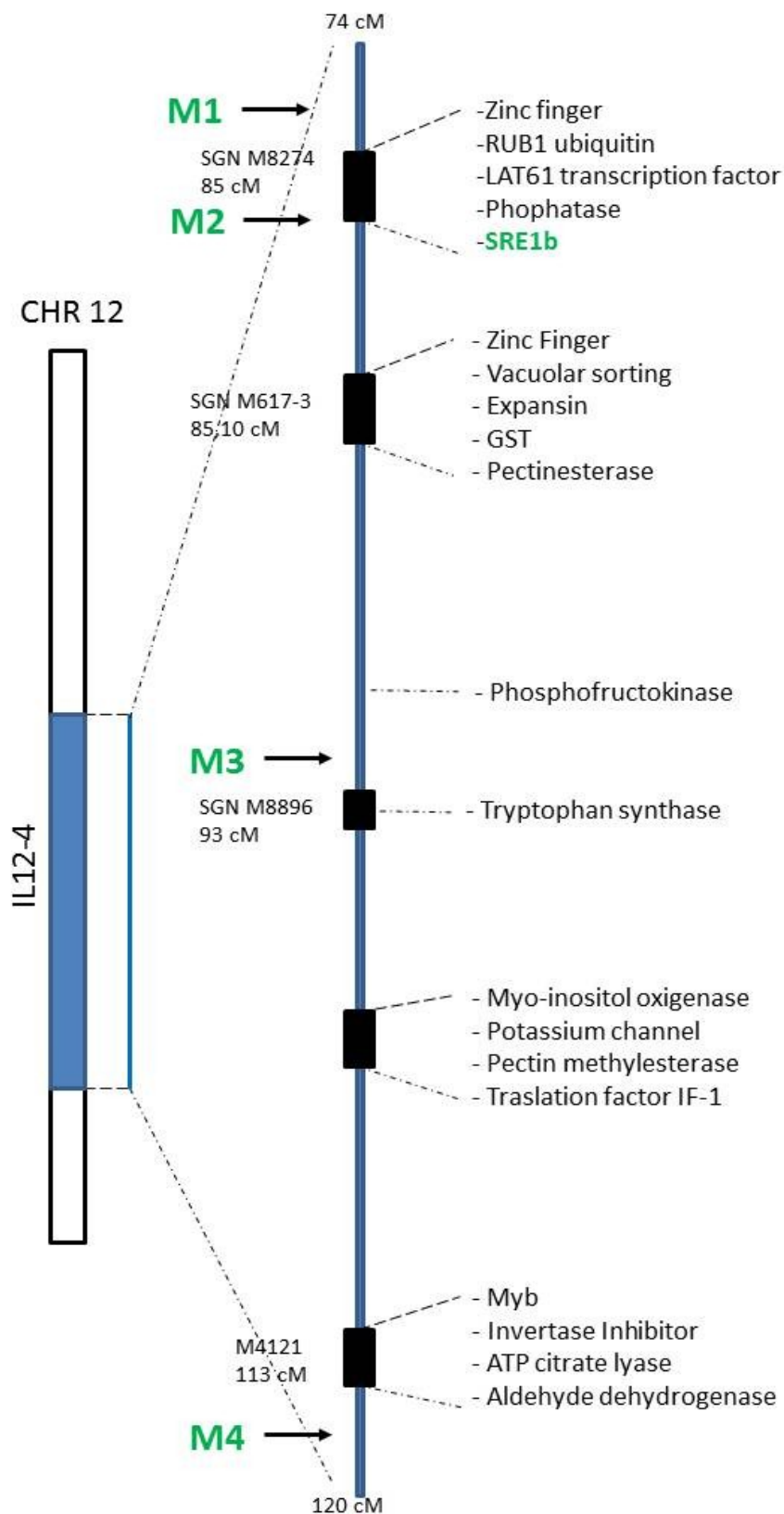


Figura 3.5 Mapping dei geni selezionati nell'introgessione 4 del cromosoma 12. I cluster sono indicati dal rettangolo nero. I marcatori utilizzati per lo screening dei ricombinanti (M1 M2 M3 M4) sono indicati in verde.

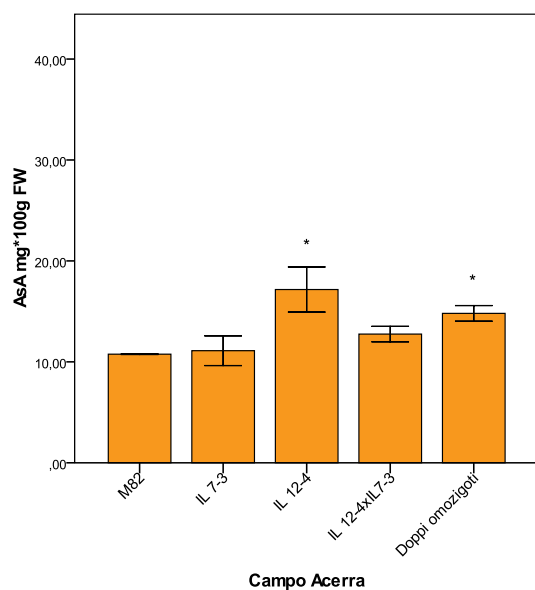
3.1.6 Valutazione fenotipica dei doppi omozigoti

Acido ascorbico

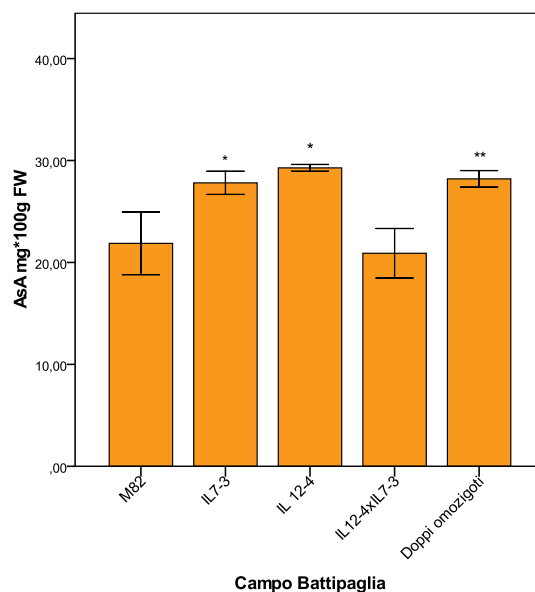
Le concentrazioni di acido ascorbico (AsA) sono state misurate su frutti di pomodoro allo stadio di rosso maturo. Le analisi sono state effettuate sui campioni risultati doppi omozigoti dallo screening molecolare in F3 allevati in tre diverse condizioni: campo sperimentale di Acerra, campo sperimentale di Battipaglia e serra. Per quanto riguarda il campo sperimentale di Acerra, la concentrazione media dei doppi omozigoti è risultata essere $14,87 \text{ mg} \cdot 100\text{g PF}^{-1}$. Nel genotipo controllo *S. lycopersicum* cv. M82 è stata misurata una concentrazione AsA di $10,76 \text{ mg} \cdot 100\text{g PF}^{-1}$ mentre nei genotipi parentali è stata misurata una concentrazione di $11,10 \text{ mg} \cdot 100\text{g PF}^{-1}$ per la IL7-3 e di $17,16 \text{ mg} \cdot 100\text{g PF}^{-1}$ per la IL12-4. **(Figura 3.6a)**. L'analisi della varianza ha evidenziato una differenza significativa ($F_{4,19}=3,579$; $p<0,05$) al test post hoc LSD tra il contenuto in AsA delle linee doppio omozigoti e il genotipo controllo M82. Inoltre come riportato in figura 3.6a anche la IL12-4 mostrava un contenuto in AsA significativamente maggiore di M82.

Per quanto riguarda il campo sperimentale di Battipaglia, la concentrazione media dei doppi omozigoti è risultata essere $28,19 \text{ mg} \cdot 100\text{g PF}^{-1}$. Nel genotipo controllo *S. lycopersicum* cv. M82 è stata misurata una concentrazione di AsA pari a $27,80 \text{ mg} \cdot 100\text{g PF}^{-1}$ mentre nei genotipi parentali è stata misurata una concentrazione di $21,87 \text{ mg} \cdot 100\text{g PF}^{-1}$ per la IL7-3 e di $29,27 \text{ mg} \cdot 100\text{g PF}^{-1}$ per la IL12-4. **(Figura 3.6b)**. L'analisi della varianza ha evidenziato differenze statisticamente significative tra il contenuto in AsA sia delle linee doppio omozigoti ($p<0,01$) che di entrambi i parentali ($p<0,5$) rispetto al genotipo controllo M82.

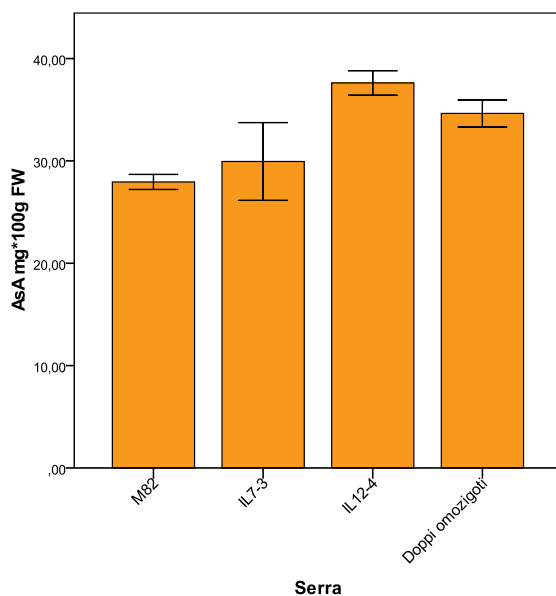
I dati ottenuti dalle piante allevate in serra, hanno mostrato una concentrazione media dei doppi omozigoti di $34,63 \text{ mg} \cdot 100\text{g PF}^{-1}$. Nel genotipo controllo *S. lycopersicum* cv. M82 è stata misurata una concentrazione AsA di $27,94 \text{ mg} \cdot 100\text{g PF}^{-1}$ mentre nei genotipi parentali è stata misurata una concentrazione di $29,94 \text{ mg} \cdot 100\text{g PF}^{-1}$ per la IL 7-3 e di $37,61 \text{ mg} \cdot 100\text{g PF}^{-1}$ per la IL12-4 **(Figura 3.6c)**. L'analisi della varianza non ha evidenziato una differenza significativa tra il contenuto in AsA delle linee doppio omozigoti e il genotipo controllo M82. Dall'analisi comparata nei tre ambienti si evince che esiste una differenza statisticamente significativa tra i valori di AsA delle piante allevate nelle diverse condizioni $P<0,001$ **(Figura 3.6 d)**.



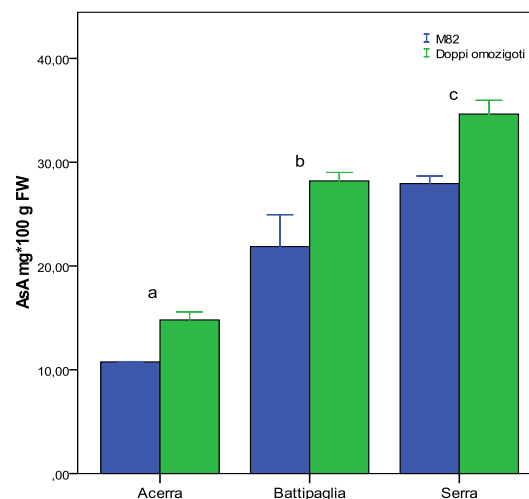
a)



b)



c)



d)

Figura 3.6 Contenuto in AsA espresso in $\text{mg} \cdot 100\text{g PF}^{-1}$ dei doppi omozigoti, dell'ibrido F1, dei parentali (IL7-3 ed IL12-4) e del controllo M82 in: a) Campo sperimentale di Acerra, b) Campo sperimentale di Battipaglia, c) Serra d) Concentrazione AsA dei doppi omozigoti rispetto al controllo M82 nelle tre diverse condizioni di allevamento. Le barre di errore indicano l'errore standard della media. * differenza significativa per $P < 0,05$; ** $0,001 < P < 0,01$ al test T di Student rispetto a M82. a, b, c: gruppi per alfa $< 0,05$ al test di Duncan

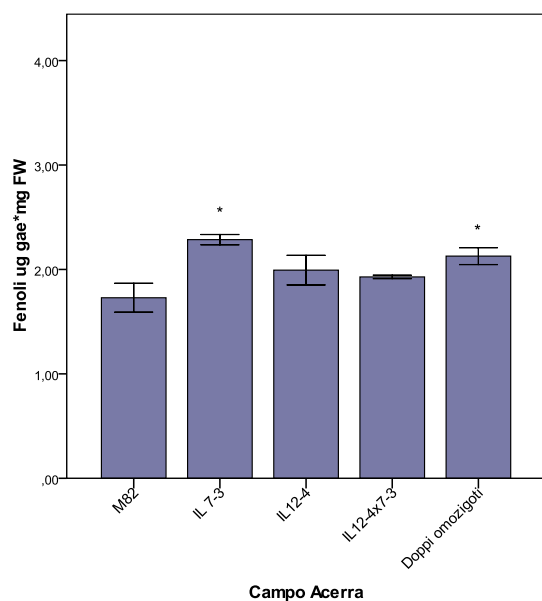
Fenoli totali

Il contenuto dei composti fenolici (Phe) è stato misurato nei frutti delle piante doppio omozigoti della generazione F3 allevate presso il campo sperimentale di Acerra, il campo di Battipaglia e in serra.

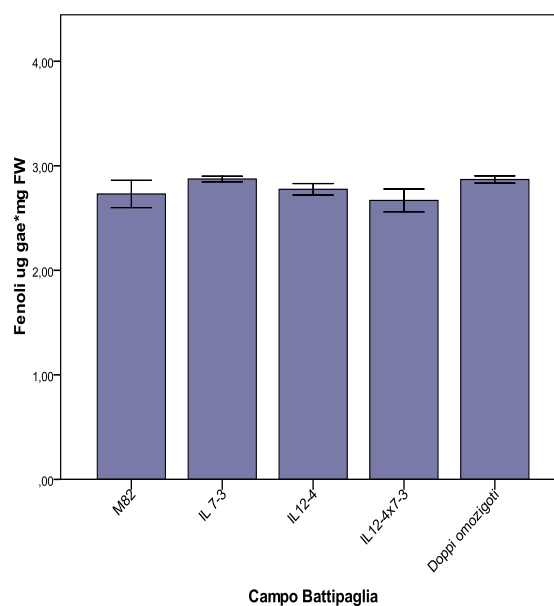
I dati relativi alle piante allevate presso il campo di Acerra hanno mostrato una concentrazione media dei fenoli totali dei doppi omozigoti di $2,12 \mu\text{g gae} \cdot \text{mg PF}^{-1}$. Il genotipo controllo M82 ha mostrato un valore medio pari a $1,71 \mu\text{g} \cdot \text{gae mg PF}^{-1}$, mentre i genotipi parentali IL12-4 ed IL7-3 hanno mostrato un contenuto medio pari a $1,99 \mu\text{g gae} \cdot \text{mg PF}^{-1}$ e $2,28 \mu\text{g gae mg} \cdot \text{PF}^{-1}$ rispettivamente. L'analisi della varianza abbinata al test post hoc LSD ha consentito di identificare una concentrazione di fenoli totali significativamente differente tra i doppi omozigoti e il controllo M82 ($F_{4,19}=2,56$; $P<0,05$) (**Figura 3.7a**). Inoltre anche la IL 7-3 ha mostrato un contenuto in Phe significativamente maggiore di M82 ($P<0,5$). Per quanto riguarda il campo sperimentale di Battipaglia, la concentrazione media dei fenoli totali è stata di $2,85 \mu\text{g gae} \cdot \text{mg PF}^{-1}$. Il genotipo controllo M82 ha mostrato un valore medio pari a $2,73 \mu\text{g gae} \cdot \text{mg PF}^{-1}$, mentre i genotipi parentali IL12-4 ed IL7-3 hanno mostrato un contenuto medio pari a $2,76 \mu\text{g gae} \cdot \text{mg PF}^{-1}$ e $2,84 \mu\text{g gae} \cdot \text{mg PF}^{-1}$ rispettivamente. L'analisi della varianza non ha mostrato differenze significative tra le linee analizzate (**Figura 3.7b**).

La concentrazione media dei fenoli totali dei doppi omozigoti allevati in serra è stata di $3,21 \mu\text{g gae} \cdot \text{mg PF}^{-1}$. Il genotipo controllo M82 ha mostrato un valore medio pari a $2,61 \mu\text{g gae} \cdot \text{mg PF}^{-1}$, mentre i genotipi parentali IL12-4 ed IL7-3 hanno mostrato un contenuto medio pari a $3,32 \mu\text{g gae} \cdot \text{mg PF}^{-1}$ e $3,38 \mu\text{g gae} \cdot \text{mg PF}^{-1}$ rispettivamente. L'analisi della varianza abbinata al test post hoc LSD ha mostrato una differenza significativa tra il parentale IL7-3, le linee doppio omozigoti e il controllo M82 ($F_{4,12}=2,71$; $P<0,05$) (**Figura 3.7c**).

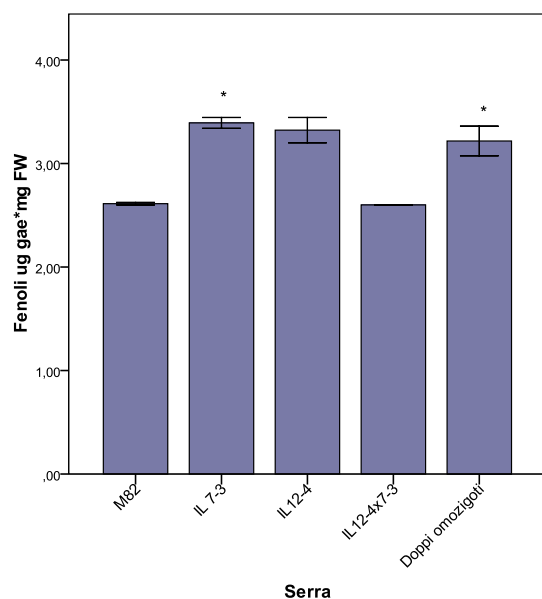
Dall'analisi comparata nei tre ambienti si evince che esiste una differenza statisticamente significativa tra i valori di fenoli totali delle piante allevate nel campo di Acerra rispetto a quelle allevate nelle altre due condizioni ($P<0,001$). Non è stata riscontrata, invece, una differenza significativa tra la condizione di allevamento nel campo sperimentale di Battipaglia in confronto a quello di serra (**Figura 3.7 d**).



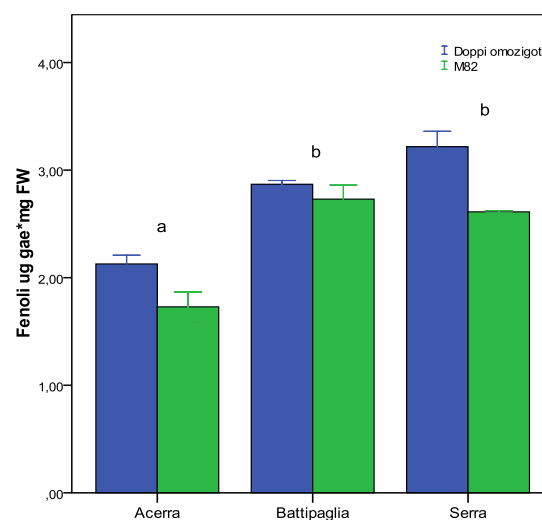
a)



b)



c)



d)

Figura 3.7 Contenuto in Phe espresso in ug gae*mg PF⁻¹ dei doppi omozigoti, dell'ibrido F1, dei parentali (IL7-3 ed IL12-4) e del controllo M82 in: a) Campo sperimentale di Acerra, b) Campo sperimentale di Battipaglia, c) Serra d) Concentrazione Phe dei doppi omozigoti rispetto al controllo M82 nelle tre diverse condizioni di allevamento. Le barre di errore indicano l'errore standard della media. * differenza statisticamente significativa per P<0,05 al test T di Student rispetto a M82. a, b: gruppi per alfa <0,05 al test di Duncan

Solidi solubili totali

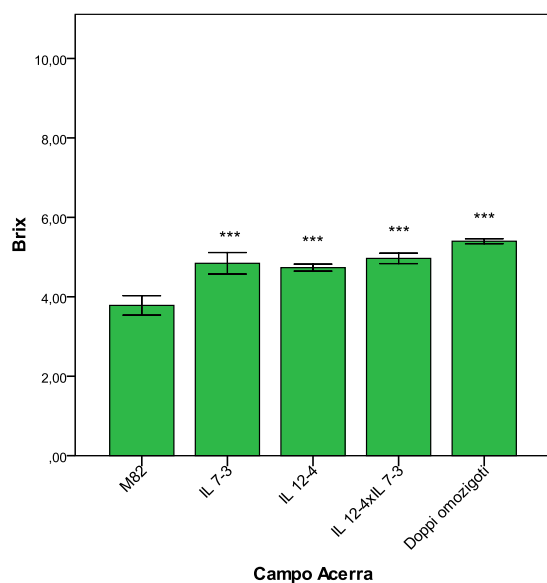
La quantità di solidi solubili è stata misurata su frutti di pomodoro allo stadio di rosso maturo. Le analisi sono state effettuate sulle piante doppio omozigoti F3 allevate presso il campo sperimentale di Acerra, di Battipaglia e in serra.

Il contenuto medio dei solidi solubili totali dei quattro genotipi doppi omozigoti nel campo di Acerra è risultato essere pari a 5,4 °Brix mentre il genotipo controllo ha mostrato un contenuto in solidi solubili pari a 3,78 °Brix. Il contenuto medio del genotipo parentale IL7-3 è risultato pari a 4,84 °Brix e quello medio del genotipo parentale IL12-4 è risultato essere 4,73 °Brix ed entrambi hanno mostrato una differenza significativa rispetto al controllo M82 ($P < 0,001$). L'analisi della varianza ha anche evidenziato una differenza significativa tra tutte le linee doppie omozigoti ($F_{7,19}=11,37$; $P < 0,001$) (**Figura 3.8a**).

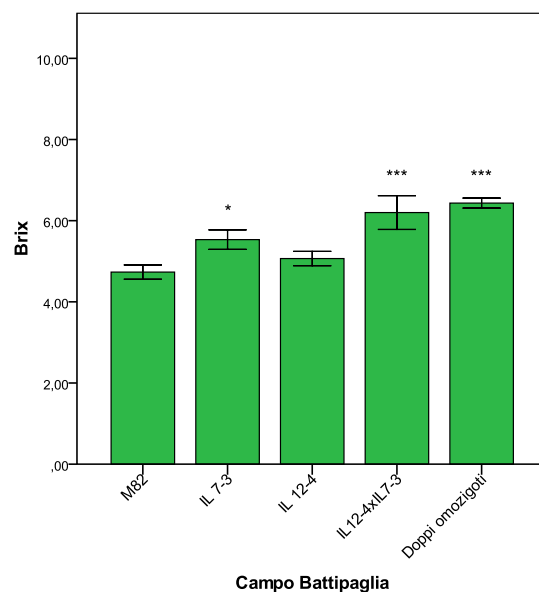
Il contenuto medio dei solidi solubili totali dei frutti maturi dei genotipi doppi omozigoti allevati a Battipaglia è risultato essere pari a 6,5 °Brix. Il genotipo controllo ha mostrato un valore pari a 4,7 °Brix mentre il contenuto medio del genotipo parentale IL7-3 è risultato essere pari a 5,53 °Brix e quello medio del genotipo parentale IL12-4 è risultato essere 5,1 °Brix (**Figura 3.8b**). L'analisi della varianza con test post hoc LSD ha evidenziato una differenza statisticamente significativa di tutte le linee doppie omozigoti ($P < 0,001$), del parentale IL7-3 ($P < 0,05$) e dell'ibrido F1 ($P < 0,01$).

Nel saggio effettuato in serra, il contenuto medio dei solidi solubili totali è risultato essere pari a 5,9 °Brix. Il genotipo controllo ha mostrato un contenuto in solidi solubili pari a 5,05 °Brix mentre il contenuto medio del genotipo parentale IL7-3 è risultato pari a 5,35 °Brix e quello medio del genotipo parentale IL12-4 è risultato essere 7,71 °Brix (**Figura 3.8c**). L'analisi della varianza ha evidenziato una differenza significativa dei doppio omozigoti ($P < 0,05$) e della linea parentale IL12-4 ($P < 0,001$) rispetto al controllo M82.

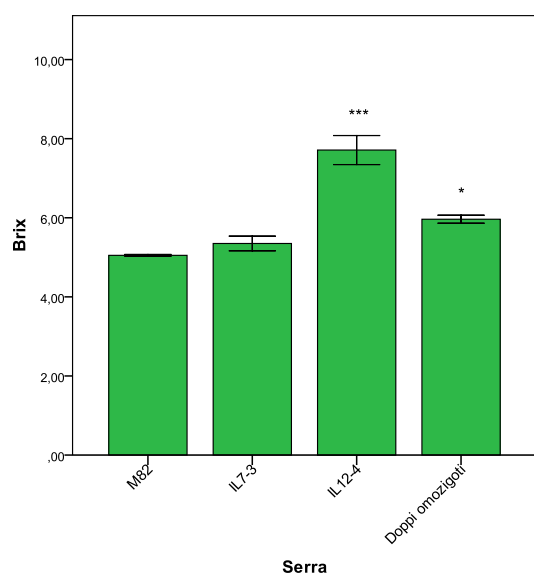
Dall'analisi comparata nei tre ambienti si evince che esiste una differenza statisticamente significativa tra i valori dei solidi solubili totali delle piante allevate nel campo di Acerra rispetto a quelle allevate nelle altre due condizioni ($P < 0,001$). Non è stata riscontrata, invece, una differenza significativa tra la condizione di allevamento nel campo sperimentale di Battipaglia in confronto a quello in serra (**Figura 3.8 d**).



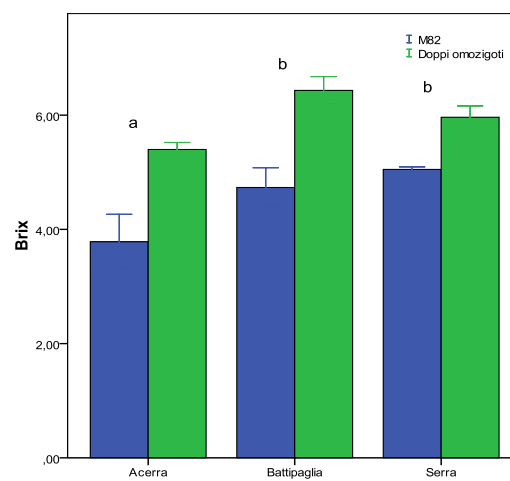
a)



b)



c)



d)

Figura 3.8 Contenuto di solidi solubili dei doppi omozigoti, dei parentali (IL7-3 ed IL12-4) e del controllo M82. in: a) Campo sperimentale di Acerra, b) Campo sperimentale di Battipaglia, c) Serra d) Concentrazione di solidi solubili totali dei doppi omozigoti rispetto al controllo M82 nelle tre diverse condizioni di allevamento. Le barre di errore indicano l'errore standard della media *** differenza statisticamente significativa per $P < 0,001$; * $P < 0,05$ al test T di Student.. a, b: gruppi per alfa $< 0,05$ al test di Duncan

3.1.7 Analisi fenotipiche delle piante ricombinanti

Per i genotipi ricombinanti dell'introgressione 4 del cromosoma 12 è stata effettuata l'analisi per valutare il contenuto di AsA e solidi solubili nei frutti allevati nel campo sperimentale di Acerra.

Per quanto riguarda il contenuto in AsA, la concentrazione media dei ricombinanti è risultata essere 21,78 mg*100g PF⁻¹. Nel genotipo controllo *S. lycopersicum* cv. M82 la concentrazione è stata 10,76 mg*100g PF⁻¹ mentre nei genotipi parentali è stata misurata una concentrazione di 11,10 mg*100g PF⁻¹ per la IL 7-3 e di 17,16 mg*100g PF⁻¹ per la IL12-4. La linea ricombinante che ha mostrato il minor contenuto è stata la F3-85 C1 con 14,39 mg*100g PF⁻¹, mentre la linea che ha mostrato il maggior contenuto è stata la F3-66 A1 con 32,47 mg*100g PF⁻¹ (**Figura 3.9**).

Inoltre il contenuto medio dei solidi solubili totali dei genotipi ricombinanti è risultato essere pari a 4,95 °Brix mentre il valore del genotipo controllo M82 e dei genotipi parentali IL7-3 ed IL12-4 è risultato essere rispettivamente 3,78 °Brix, 4,84 °Brix e 4,73 °Brix. Il genotipo ricombinante che ha mostrato il contenuto maggiore è stato A7-F3-66 A1 con un valore di 5,20 °Brix. (**Figura 3.10**).

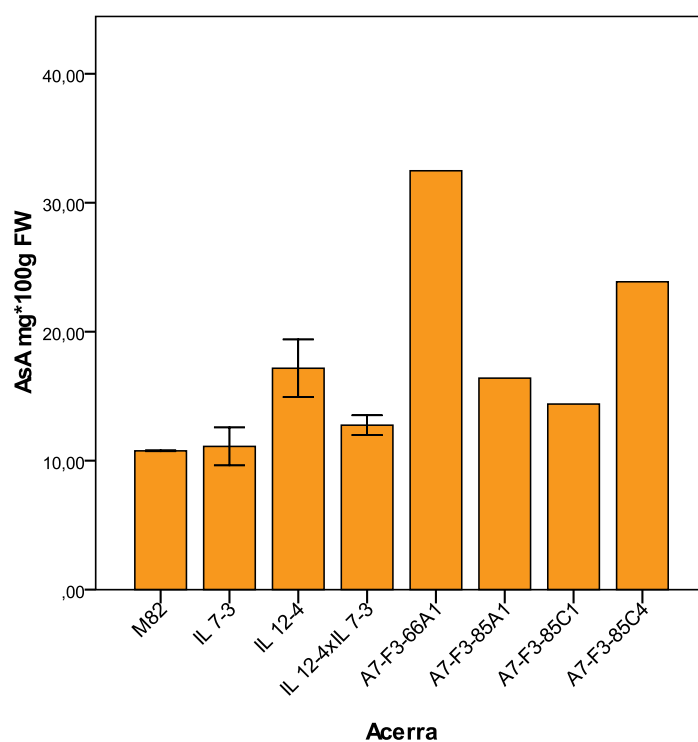


Figura 3.9 Contenuto in AsA espresso in $\text{mg} \cdot 100\text{g PF}^{-1}$ dei ricombinanti, dell'ibrido F1, dei parentali (IL7-3 ed IL12-4) e del controllo M82. Le barre di errore indicano l'errore standard della media.

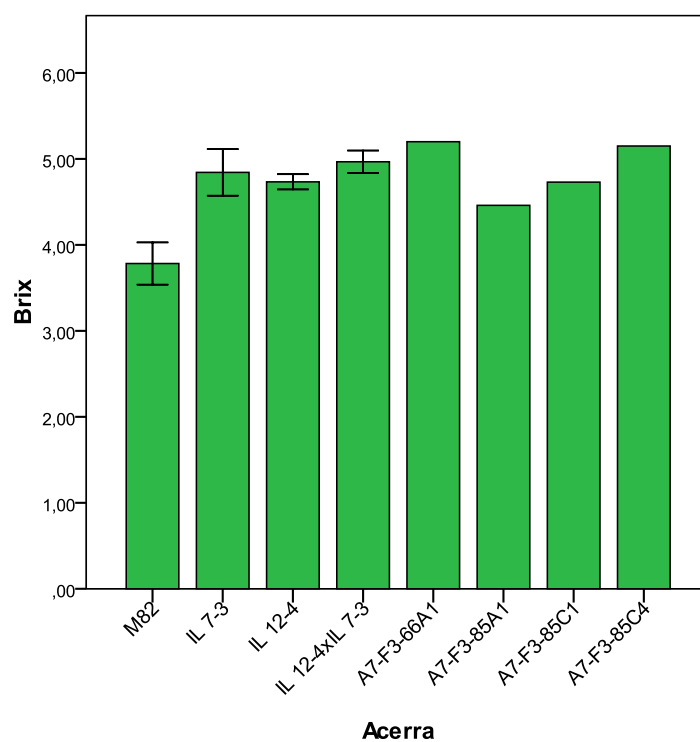


Figura 3.10 Contenuto di solidi solubili dei ricombinanti, dell'ibrido F1, dei parentali (IL7-3 ed IL12-4) e di M82. Le barre di errore indicano l'errore standard della media.

3.2 Analisi della progenie IL6-3xIL2-2

3.2.1 Selezione di marcatori polimorfici

Allo scopo di identificare piante doppio omozigoti nella progenie dell'incrocio tra IL2-2 e IL6-3 è stata effettuata una selezione assistita con marcatori molecolari. I primer sono stati scelti nella mappa Tomato EXPEN 2000 del Sol Genomics Network e per effettuare l'analisi sono stati scelti dei marcatori localizzati nella parte superiore, mediana e inferiore dell'introgressione specifica dei 2 cromosomi (**Figura 3.11**).

Per l'analisi della zona superiore dell'introgressione 2-2 è stata scelta la coppia di primer K1 del marcatore T0888 che ha prodotto un amplicone di 1055 bp nella linea IL2-2 mentre ha prodotto un amplicone di 860 bp nella linea IL6-3 (utilizzata in questo caso come controllo coltivato). Per la regione mediana dell'introgressione 2-2 è stato scelto il marcatore SCAR K2 il cui amplificato risulta di 960 bp nella linea IL2-2 di 660 bp nella linea IL6-3. Per la zona inferiore della stessa introgressione è stato scelto il marcatore K3, in cui l'amplificato è stato digerito con l'enzima *Hind III*: in questo caso il frammento PCR non è stato tagliato nella linea IL2-2, mentre ha prodotto due frammenti (550 bp e 270 bp) nella linea IL6-3.

Per la zona superiore dell'introgressione nella regione 3 del cromosoma 6 è stata usata la coppia di primer V1, e gli amplificati prodotti sono stati digeriti con l'enzima *RsaI*: i frammenti ottenuti nella linea IL6-3 sono risultati di 190 bp e 250 bp, mentre quelli ottenuti nella linea IL2-2 (utilizzata in questo caso come controllo coltivato) è risultato di 440 bp. La zona mediana per l'introgressione 6-3 è stata analizzata con una coppia di primer V2, il cui amplificato di 1100 bp è stato digerito con *EcoRV* producendo due frammenti per la IL2-2 di 450 bp e 550 bp e nessun frammento per la IL6-3. Per la zona inferiore dell'introgressione 6-3 è stato scelto il marcatore SCAR V3 e attraverso l'amplificazione con PCR è stato possibile distinguere i due alleli di 700 bp nella linea IL6-3 e di 950 bp nella linea IL2-2 (**Tabella 3.5**).

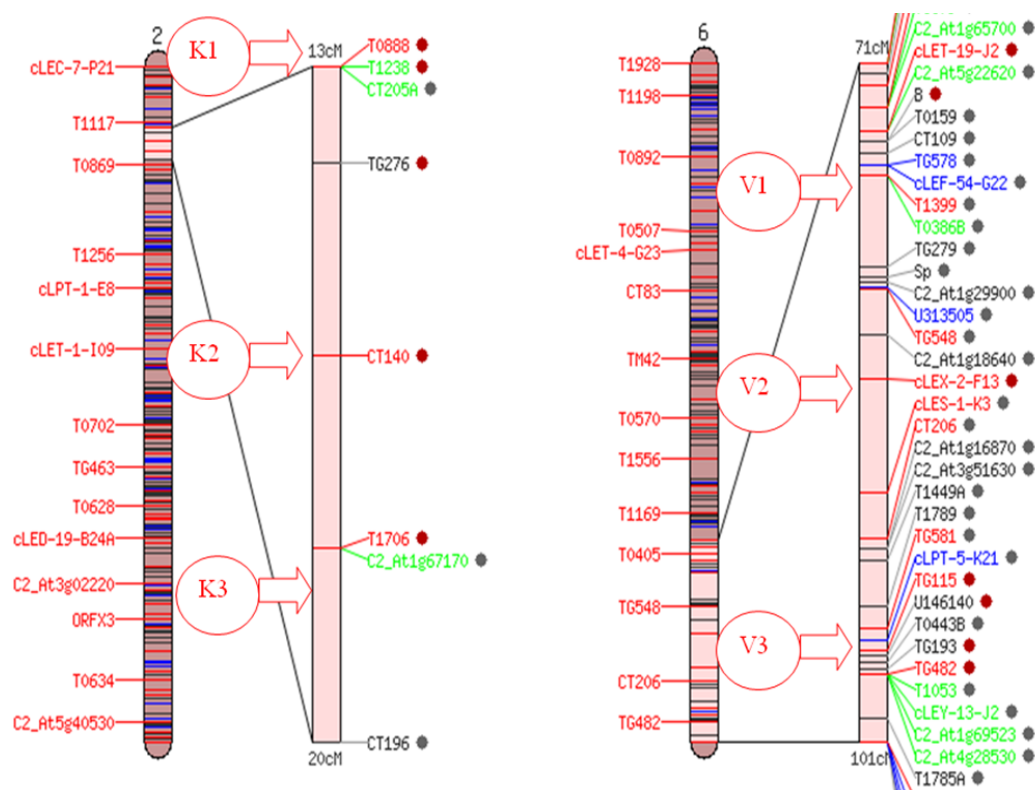


Figura 3.11 Posizione sui cromosomi 2 e 6 dei marcatori utilizzati per l'analisi molecolare della progenie derivante dall'incrocio IL6-3xIL2-2 (<http://www.sgn.cornell.edu>)

Tabella 3.5 Marcatori utilizzati per le analisi molecolari delle piante derivanti dall'incrocio IL6-3xIL2-2: sono riportate le condizioni di amplificazione e digestione, la dimensione dei frammenti polimorfici.

	Marcatore Molecolare	Sequenze dei primer 5'→3'	Codice	T annealing	Dimensione amplificato	Enzima di restrizione	T digestione	Prodotti di digestione bp	
				°C	bp		°C	IL6-3	IL2-2
IL 2-2	T0888	F: GAATCGGAGCAAGTAACTCAGTC R: GAGTTTGAGGTTACTCGTTATGTC	K1	58°C	1055/860	-	-	-	-
	CT140	F: ATCCATCCGATTATCCCTTCCG R: TGAGACTGAACTCGCCATGCTC	K2	54°C	960/660	-	-	-	-
	U569823	F: ACAACAGCTGCTATTACTACCG R: TTCTTGCCGGAGATAGAGGTGG	K3	56°C	820	<i>HindIII</i>	37	550+270	820
IL6-3	T03868	F: TGCAGGTATGTCTCACACCA R: TGCAACAAGTGGATAGGTCTG	V1	57°C	440	<i>RsaI</i>	37	190+250	440
	Tg326	F: CGTGGACTACCTAACTAGCAGAC R: TGTGTGTTGGACGTAGGCCATG	V2	52°C	1100	<i>EcoRV</i>	37	1100	450+550
	U146153	F: CTTTCATGATTACACTTTGCCATTAT R: GATTACCTCAGGAGGGCTTAACC	V3	60°C	950/700	-	-	-	-

F: forward

R: reverse

3.2.2 Screening molecolare di piante F2

L'analisi molecolare è stata effettuata sul DNA di 100 piante derivanti dall'autofecondazione di ibridi F1 IL6-3xIL2-2. È stato amplificato il DNA utilizzando i primer specifici per le due introgressioni, e gli amplificati sono stati digeriti con gli specifici enzimi di restrizione. I risultati delle analisi molecolari sono stati visualizzati su gel di agarosio e in base al profilo elettroforetico è stato possibile distinguere agli specifici loci la condizione omozigote per il genoma selvatico (+/+), quella eterozigote (+/-).

In **Tabella 3.6** è riassunta l'analisi molecolare effettuata sulle piante F2.

Considerando la segregazione delle due introgressioni, sono state identificate 5 piante omozigoti per entrambe le introgressioni (A13, A24, A72, A90, A98), 8 piante eterozigoti per l'introgressione 2-2 ed omozigoti per la 6-3 (A6, A34, A38, A43, A51, A66, A69, A93), 11 piante eterozigoti per entrambe le introgressioni (A2, A11, A27, A29, A33, A39, A44, A50, A56, A77, A82), 1 pianta omozigote per l'introgressione 2-2, ed eterozigote per la 6-3 (A81). Tutte le altre combinazioni contenenti la non introgressione di almeno un segmento selvatico, non sono state considerate.

Tabella 3.6 Analisi effettuata con i marcatori molecolari sul DNA di piante F2 derivanti dall'incrocio IL6-3xIL2-2. +/+ : condizione omozigote per genoma selvatico; +/-: condizione eterozigote.

	Marcatori per IL2-2			Marcatori per IL6-3		
	K1	K2	K3	V1	V2	V3
A2	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
A6	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+
A11	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
A13	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
A24	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
A27	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
A29	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
A33	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
A34	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+
A38	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+
A39	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
A43	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+
A44	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
A50	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
A51	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+
A56	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
A66	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+
A69	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+
A72	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
A77	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
A81	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+
A82	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
A90	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
A93	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+
A98	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+

3.2.3 Valutazione del contenuto in carotenoidi

Le concentrazioni di carotenoidi sono state misurate su frutti di pomodoro allo stadio di rosso maturo dei campioni risultati doppi omozigoti dallo screening molecolare in F2. I frutti delle piante doppio omozigoti isolate dalla progenie dell'incrocio, i rispettivi parentali (IL2-2, IL6-3) e il genotipo di riferimento M82 sono stati sottoposti all'analisi HPLC per verificarne il contenuto in carotenoidi. In particolare è stato valutato il contenuto in *cis*-Licopene, *trans*-Licopene, Luteina, β -carotene, γ -carotene, Z-Carotene, Fitofluene e Fitoene. In **Tabella 3.6** sono riportati i valori dei doppi omozigoti, del controllo e delle linee parentali dei metaboliti analizzati, espressi in $\mu\text{g} \cdot \text{g PF}^{-1}$.

Tra i metaboliti analizzati, solo il β -carotene e il *trans*-licopene hanno mostrato differenze statisticamente significative all'analisi della varianza tra le linee doppio omozigoti e il controllo M82 ($P < 0,001$). La concentrazione media dei doppi omozigoti per il β -carotene è risultata essere $42,5 \mu\text{g} \cdot \text{g PF}^{-1}$. Nel genotipo controllo *S. lycopersicum* cv. M82 è stata misurata una concentrazione di $1,2 \mu\text{g} \cdot \text{g PF}^{-1}$, mentre nei genotipi parentali è stata misurata una concentrazione di $6,3 \mu\text{g} \cdot \text{g PF}^{-1}$ per la IL2-2 e di $31,2 \mu\text{g} \cdot \text{g PF}^{-1}$ per la IL6-3.

I doppi omozigoti analizzati hanno mostrato una riduzione significativa per il *trans*-licopene all'analisi della varianza rispetto a M82. In particolare, è stato osservato un contenuto medio in *trans*-licopene nei doppi omozigoti di $1,1 \mu\text{g} \cdot \text{g PF}^{-1}$ mentre in M82 è stato osservato un valore medio di $89,3 \mu\text{g} \cdot \text{g PF}^{-1}$. I genotipi parentali IL2-2 ed IL6-3 hanno mostrato rispettivamente un contenuto medio pari a $72,5 \mu\text{g} \cdot \text{g PF}^{-1}$ e $28,9 \mu\text{g} \cdot \text{g PF}^{-1}$.

Tabella 3.7 Valori medi e deviazione standard di otto metaboliti appartenenti alla classe dei carotenoidi nelle linee doppio omozigoti, nei parentali e nel controllo M82.

	Doppi omozigoti	M82	IL2-2	IL6-3
Fitoene	2,3±0,4	5,4±0,6	4,3±0,5	6,2±0,45
Fitofluene	1,1±0,05	3,5±0,4	2,6±0,8	2,8±0,5
Z-carotene	1,05±0,15	0,7±0,03	0,65±0,05	1,08±0,1
Luteina	0,8±0,06	0,6±0,07	0,9±0,05	0,65±0,05
β-carotene	42,5±5,6 ***	1,2±0,1	6,3±0,9	31,2±2,8****
γ-carotene	0,9±0,05	4,4±0,8	4,8±0,6	4,6±0,4
cis-licopene	0,1±0,01	2,4±0,015	0,1±0,01	2±0,2
trans-licopene	1,1±0,1***	89,3±10,1	75,2±10,7	28,9±2,5****

*** P<0,001 al test T di student rispetto a M82

3.2.4 Analisi HPLC per il contenuto in carotenoidi nella sub IL2-2-1

E' stato analizzato il contenuto in carotenoidi della sub linea IL2-2-1 e del controllo M82 in cinque diversi stadi di maturazione del frutto, in particolare, allo stadio di verde maturo (MG), invaiato (BR) e a 3 (B3), 7 (B7) e 10 (B10) giorni dallo stadio di invaiato. Le analisi sono state condotte mediante HPLC ed è stato valutato, in particolare, il livello di β -carotene, *cis* e *trans*- lycopene, fitoene, fitofluene, luteina, clorofilla A e clorofilla B.

I metaboliti analizzati presentano profili simili nelle due linee, fatta eccezione per il livello di β -carotene e di *cis*-licopene (**Figura 3.12**). Per quanto riguarda il primo, infatti, si nota un incremento statisticamente significativo del contenuto nella sub IL2-2-1 in confronto al controllo M82 a partire dalla fase di invaiato + 3 giorni. Il valore massimo del metabolita si ottiene a 10 giorni dallo stadio di invaiato che risulta per la IL2-2-1, essere pari a $3,4 \text{ ug} \cdot \text{g PF}^{-1}$, mentre per il controllo M82 di $1,8 \text{ ug} \cdot \text{g PF}^{-1}$. Per quanto riguarda il *cis*-licopene, invece si evidenzia una diminuzione significativa del contenuto nella sub IL2-2-1 in confronto al controllo M82, sempre a partire dalla fase di invaiato + 3 giorni. Per la IL2-2-1 si evidenziano valori contenuti del metabolita, durante tutti gli stadi di maturazione (da 0,1 a $0,4 \text{ ug} \cdot \text{g PF}^{-1}$), mentre per il controllo si evidenziano valori nettamente superiori che raggiungono $3,7 \text{ ug} \cdot \text{g PF}^{-1}$ allo stadio di invaiato + 7 giorni (B7).

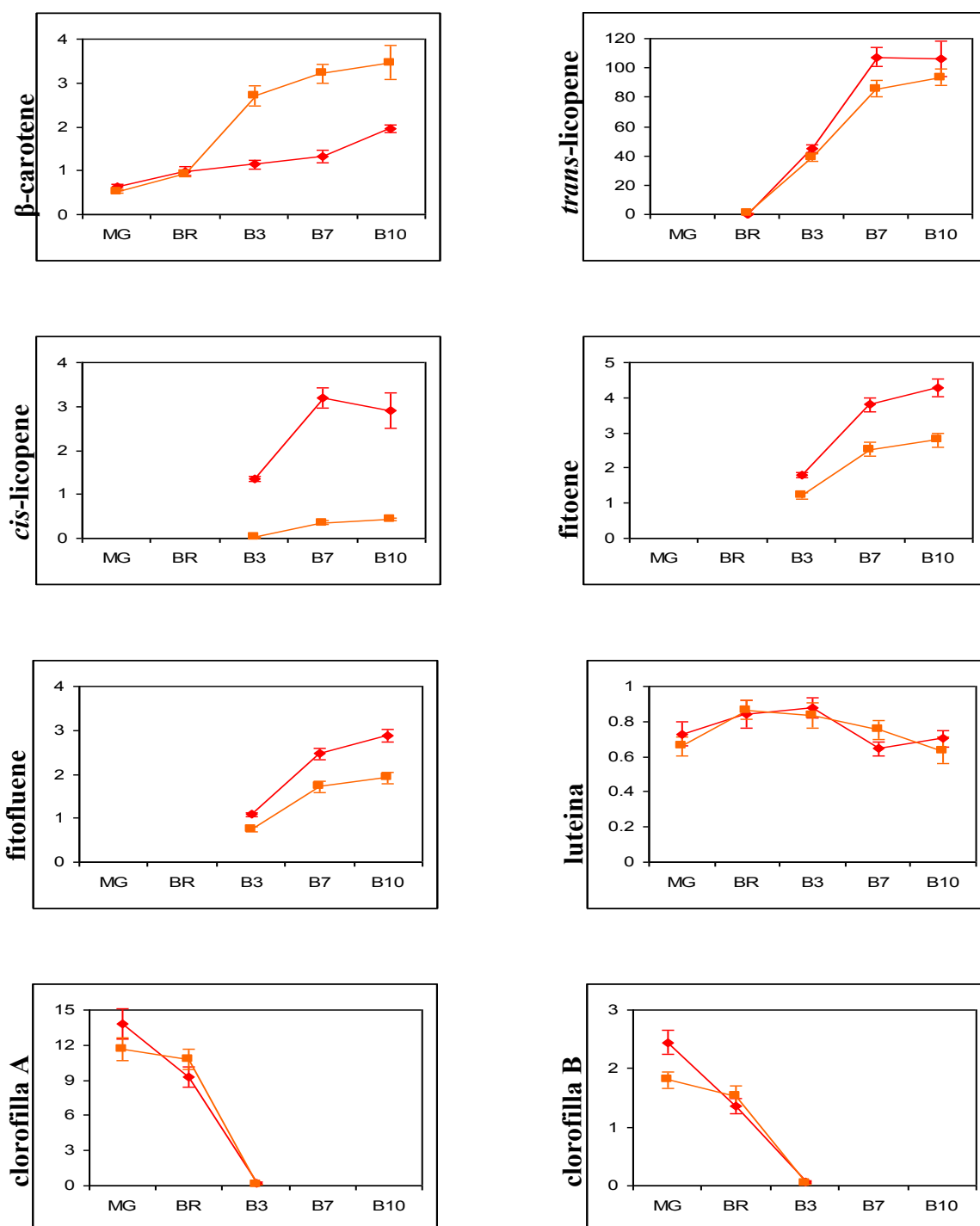


Figura 3.12 Contenuto in β -carotene, *cis* e *trans*- lycopene, fitoene, fitofluene, luteina, clorofilla A e clorofilla B della sub linea IL2-2-1 e del controllo M82 agli stadi di verde maturo (MG) , invaiato (BR), a 3 (B3), 7 (B7) e 10 (B10) giorni dallo stadio di invaiato. I doppi omozigoti sono rappresentati in arancione e il controllo M82 è rappresentato in rosso.

3.2.5 Analisi trascrizionale dei geni del pathway dei carotenoidi

Per valutare le differenze nei livelli di espressione tra la sub IL2-2-1 e il controllo M82, i trascritti di 11 geni coinvolti nella via biosintetica dei carotenoidi, sono stati valutati mediante RT-qPCR. In particolare sono stati quantizzati i trascritti dei geni: licopene β -ciclastasi cromoplasto spereifica (CYC B), licopene β -ciclastasi (LCY-B), carotenoid-isomerasi (CRTISO), β -carotene idrossilasi (CrtR b1 e CrtR b2), zeaxantina epossidasi (ZEP), fitoene desaturasi (PDS), carotenoid-diossigenasi (CCD1A e CCD1B), fitoene sintasi (PSY 2), Z-carotene isomerasi (Z-ISO).

Nessuna evidenza statisticamente significativa è stata riscontrata dall'analisi, ad esclusione del gene CrtR b2 che allo stadio di rosso maturo +7 giorni (B7), ha mostrato nella linea IL 2-2-1 un aumento del livello di espressione di circa 4 volte rispetto al controllo M82. In **Tabella 3.8** sono riportati i valori delle quantificazioni Real Time degli 11 geni, con la relativa deviazione standard, nei tre stadi di maturazione presi in considerazione corrispondenti a invaiato (BR), invaiato+3 giorni (B3), invaiato +7 giorni (B7).

Tabella 3.8 Quantità relativa \pm deviazione standard dell'espressione dei trascritti di 11 geni coinvolti nel pathway dei carotenoidi nei tre stadi di maturazione invaiato (BR), invaiato+3 giorni (B3), invaiato +7 giorni (B7).

	BR	B3	B7
CYC B	1.6 \pm 0.35	1.5 \pm 0.4	1.1 \pm 0.2
LCY B	0.6 \pm 0.1	1.1 \pm 0.2	1.05 \pm 0.2
Crt ISO	0.9 \pm 0.15	0.9 \pm 0.2	1.6 \pm 0.3
CrtR B1	1.7 \pm 0.2	0.67 \pm 0.4	1.6 \pm 0.1
CrtR B2	0.6 \pm 0.2	0.62 \pm 0.25	4.4 \pm 0.1 *
CCD1A	0.4 \pm 0.3	1.1 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1
ZEP	0.9 \pm 0.1	0.88 \pm 0.1	1.6 \pm 0.2
PDS	1.3 \pm 0.2	1.63 \pm 0.3	1.1 \pm 0.2
CCD1B	1.2 \pm 0.1	0.71 \pm 0.4	1.58 \pm 0.1
PSY 2	0.7 \pm 0.15	0.54 \pm 0.3	1.2 \pm 0.15
Z-ISO	0.7 \pm 0.1	0.54 \pm 0.4	1.27 \pm 0.2

*: P< 0,05

4 Discussione

4.1 Selezione assistita da marcatori molecolari

Il pomodoro coltivato *Solanum lycopersicum* appartiene al genere delle *Solanaceae*, una famiglia che include più di 3000 specie. Queste specie mostrano un'ampia variabilità di caratteri quali adattamento a diversi habitat, morfologia della pianta, forma e grandezza del frutto differente, e presenza di diversi metaboliti. Queste caratteristiche fanno delle specie selvatiche di *Solanum* un'ottima fonte di geni per condurre programmi di breeding (Bai e Lindhout, 2007; Gur e Zamir, 2004). La specie coltivata è una specie diploide ($2n=24$), è autogama e può essere facilmente incrociata con le specie selvatiche. Tutto ciò ha reso *Solanum lycopersicum* una specie oggetto di analisi genetiche. Inoltre, vista l'elevata sintonia esistente tra le specie di *Solanum* (Wu e Tanksley, 2010), il pomodoro è stato scelto come genoma di riferimento da sequenziare nell'ambito dell' International Tomato Genome Sequencing Consortium (Mueller *et al.*, 2005). Molte sono le informazioni genetiche disponibili per il pomodoro, tra cui la versione completa del genoma sequenziato (www.solgenomics.net). Inoltre, per il pomodoro è disponibile un elevato numero di marcatori molecolari, presenti sul sito SolGenomicsNetwork. Non mancano analisi trascrittomiche mediante esperimenti microarray effettuati su tessuti differenti o a diversi stadi di sviluppo (Karlova *et al.*, 2011; Tiwakik, 2011; Povero *et al.*, 2011). Tutti questi strumenti rendono il pomodoro molto interessante per l'ottenimento di nuove varietà con caratteristiche desiderate, quali la resistenza agli stress o il miglioramento della qualità del frutto.

In particolare, il miglioramento genetico per il trasferimento di caratteri quantitativi si avvale come strumento della MAS, la selezione assistita da marcatori. I marcatori molecolari rappresentano uno strumento autorevole per la definizione della diversità genetica e sono uno degli strumenti più efficaci delle biotecnologie nel miglioramento genetico vegetale, in quanto non comportano alterazioni e/o mutazioni del DNA, ma ne rilevano solo le variazioni nelle diverse generazioni d'incrocio, consentendo di accelerare notevolmente i tempi e di ridurre gli spazi di qualsiasi programma di selezione, aumentando così l'efficienza dei metodi classici di miglioramento genetico. Pertanto è di cruciale importanza esplorare la complementarità tra MAS e breeding tradizionale e sviluppare strategie che integrino i due approcci. Una delle più interessanti applicazioni della selezione assistita è l'uso di marcatori molecolari durante i programmi di reincrocio, il cui obiettivo è quello di trasferire geni di interesse da una specie donatrice ad una ricevente (Mohan *et al.*, 1997). L'utilizzo di marcatori molecolari associati al

carattere che si vuole trasferire permette di ridurre il numero di reincroci necessari a questo trasferimento. I marcatori molecolari per programmi di miglioramento genetico sono utili anche per il trasferimento di più geni in una specie ricevente diventando un utile strumento per la selezione di nuovi genotipi caratterizzati dalla presenza di specifici caratteri quantitativi (detti anche “poligenici” proprio perché controllati da più geni), come ad esempio quelli associati ad un maggiore accumulo di antiossidanti nei frutti (Stevens *et al.*, 2007; Rosseaux *et al.*, 2005). E’ di notevole interesse la possibilità di “restituire” alla specie coltivata i geni di interesse agroalimentare che, persi a causa della domesticazione subita nel corso degli anni, sono presenti nelle forme ancestrali della pianta di pomodoro.

Dato che il pomodoro apporta un importante contributo alla nutrizione umana a livello mondiale (Willcox *et al.*, 2003), tra i diversi obiettivi del miglioramento genetico suscita un crescente interesse la possibilità di incrementare i livelli di antiossidanti nel frutto. Per realizzare questo obiettivo si possono utilizzare le linee di introgressione (IL), che si sono rivelate particolarmente utili nello studio dei caratteri quantitativi e nell'identificazione di QTL per il miglioramento del pomodoro (Lippman *et al.*, 2007). Poiché la specie selvatica *Solanum pennellii* ha un contenuto di antiossidanti maggiore rispetto alla specie coltivata, linee d'introgressione (IL) di *S. pennellii* (accessione LA0716) in *S. lycopersicum* cv. M82 (specie coltivata) sono state utilizzate per l'identificazione di alcuni QTL che controllano il contenuto di antiossidanti in pomodoro. Rousseaux *et al.*, (2005) ad esempio utilizzando una popolazione di linee di introgressione di *S. pennellii* hanno identificato un totale di 20 QTL tra i quali 6 per l'acido ascorbico e 9 per i fenoli totali. Alcuni di questi QTL hanno portato ad un incremento del livello in antiossidanti nel frutto in confronto alla linea parentale (*S. lycopersicum*) mentre altri ad una diminuzione della concentrazione del metabolita studiato. Per il contenuto in licopene, sono stati identificati quattro QTL nessuno dei quali ha portato ad un aumento della concentrazione rispetto a *S. lycopersicum*. Per il β -carotene sono stati individuati due QTL responsabili di un incremento del contenuto di β -carotene nel frutto. Nello studio è inoltre riportata la forte interazione con l'ambiente, infatti solo il 35% dei QTL identificati sono risultati stabili in almeno due stagioni. Le analisi dimostrano che l'introgressione del germoplasma selvatico è in grado di migliorare la qualità nutrizionale dei pomodori, sebbene la regolazione appare complessa e con forti interazioni ambientali.

In questo lavoro sono state scelte le linee di introgressione IL12-4, IL7-3, IL6-3, IL2-2 e IL2-2-1 in quanto le prime due hanno mostrato un maggiore accumulo nel frutto di acido ascorbico e fenoli rispetto alla specie coltivata (Di Matteo *et al.*, 2010), e le altre tre hanno mostrato un maggiore accumulo di carotenoidi nel frutto (Liu, 2003). Tali linee sono state

incrociate per realizzare due diversi schemi di breeding finalizzati a raggruppare (pyramiding) diversi QTL nello stesso genotipo. In particolare, l'incrocio tra le linee IL12-4 e IL7-3 è stato finalizzato a realizzare il pyramiding di 2 QTL positivi per il contenuto di acido ascorbico nei frutti (uno identificato nella IL12-4 e uno nella IL7-3), 1 QTL positivo per il contenuto in fenoli (presente nella linea IL7-3) e 1 QTL positivo per il livello di solidi solubili (presente nella linea IL12-4). L'incrocio tra le linee IL6-3 e IL2-2 è stato, invece, realizzato per ottenere il pyramiding di 2 QTL positivi (un QTL per linea) per l'aumento del contenuto di carotenoidi nel frutto.

Tale lavoro di pyramiding è stato reso più efficiente dalla selezione assistita da marcatori molecolari, che è iniziata con la identificazione di un idoneo numero (almeno 3) di marcatori polimorfici per ciascuna regione introgressa. La posizione dei marcatori nella parte alta, intermedia e bassa di ciascuna introgressione ha consentito di selezionare nelle progenie segreganti i genotipi doppi omozigoti per entrambe le regioni selvatiche specifiche di ciascuno schema di breeding.

In particolare, l'analisi molecolare realizzata sulla generazione F₂ dell'incrocio tra le due linee di introgressione IL12-4 e IL7-3 ha permesso l'identificazione di piante che presentavano una condizione di omozigosi ad entrambi i cromosomi, una condizione omozigote per il selvatico in uno dei due cromosomi, la condizione eterozigote ad una delle due regione esaminate e condizioni intermedie tra quelle descritte. Quattro genotipi sono risultati doppi omozigoti, in particolare, le linee A7-45, A7-73, A7-83 e A7-88. I semi F₃ ottenuti dai 4 genotipi doppi omozigoti hanno consentito di valutare questi genotipi in tre diverse condizioni sperimentali: allevamento in pieno campo (Battipaglia), allevamento in campo sotto copertura di rete (Acerra), allevamento in vaso sotto serra (Portici). Tale piano sperimentale ha consentito un confronto tra le diverse condizioni di allevamento per valutare le concentrazioni di AsA, fenoli totali e solidi solubili nei frutti.

Per quanto riguarda lo screening molecolare nella progenie F₂ dell'incrocio IL6-3xIL2-2 sono state individuate le linee che hanno mostrato omozigosi ed eterozigosi ad almeno una delle due introgressioni considerate, permettendoci quindi di selezionare le 5 piante doppio omozigoti sulle quali è stato effettuato il saggio per valutare la concentrazione in carotenoidi.

Per entrambi gli schemi di breeding è perciò stato possibile selezionare piante F₂ o F₃ doppie omozigoti da avviare alle analisi fenotipiche per valutare l'effetto del pyramiding sul contenuto di antiossidanti presenti nel frutto. Infatti, i risultati ottenuti con gli studi di analisi QTL in pomodoro ed altre specie indicano che il trasferimento di QTL multipli o "QTL pyramiding", è l'approccio più promettente per produrre nuove varietà migliorate, sia per fenotipi associati

alla produzione, che ad altri caratteri quantitativi (Lawson *et al.*, 1997; Ashikari e Matsuoka, 2006).

Un esempio dell'utilità di questa strategia è lo studio condotto da Gur e Zamir nel 2004, in cui una IL multipla è stata sviluppata trasferendo tre regioni genomiche indipendenti influenzanti la produzione, dall'accessione selvatica *S. pennellii* (LA0716) tollerante alla siccità nel background genetico del parentale ricorrente M82. Gli ibridi risultanti mostravano un incremento di produzione del 50% rispetto alla varietà commerciale usata come controllo quando testati in diversi ambienti e regimi di irrigazione.

4.2 Antiossidanti nel frutto di pomodoro

L'interesse nel costituire varietà con resa, taglia, forma e proprietà organolettiche migliorate è stato da sempre l'obiettivo dei tradizionali programmi di breeding nel pomodoro (Frary *et al.*, 2003; van der Knaap *et al.*, 2004; Chaib *et al.*, 2006). Tuttavia negli ultimi anni sempre maggiore è stato l'interesse verso la costituzione di varietà con migliorate qualità dei frutti, spinti anche dai risultati degli ultimi studi che hanno messo in luce l'importanza nutrizionale dell'acido ascorbico, del licopene, dei flavonoidi e dell'acido clorogenico nella dieta umana (Davuluri *et al.*, 2005; Dixon, 2005; Niggeweg *et al.*, 2006; Rein *et al.*, 2006). Molti miglioramenti in tal senso sono altamente desiderabili considerando che molto spesso la componente nutrizionale associata a quella del gusto è andata persa a causa dell'erosione genetica associata alla diffusione su larga scala delle varietà migliorate (Goff e Klee, 2006; Morris e Sands, 2006). In questo studio sono state valutate le concentrazioni di acido ascorbico, fenoli, carotenoidi e solidi solubili in due progenie ottenute dall'incrocio di linee di introgressione di *S. pennellii*. Queste ultime sono state già utilizzate per mappare i geni ed i QTL candidati per i carotenoidi e il colore dei frutti (Liu *et al.*, 2003), per il peso dei frutti e la composizione in zuccheri ed acidi (Causse *et al.*, 2004), per i composti antiossidanti, (Rousseaux *et al.*, 2005), per l'acido ascorbico (Di Matteo *et al.*, 2010) ed altri metaboliti (Schauer *et al.*, 2006).

4.2.1 Pyramiding di QTL per acido ascorbico, fenoli e solidi solubili

Alti livelli di Vitamina C nei frutti di pomodoro forniscono benefici per la salute, prevenzione dalle malattie cardiovascolari, sviluppo dei sistemi immunologici e dei tessuti connettivi. (Stahl e Sies, 2001).

Nelle piante l'attività antiossidante dell'AsA rende questa sostanza un componente cruciale nelle risposte agli stress (Conklin *et al.*, 2004) e nella trasduzione del segnale di difesa e di sviluppo (Pastori *et al.*, 2003). Per adempire un ruolo così importante, la sintesi dell'acido ascorbico deve essere finemente regolata. Differenti pathways alternativi sono stati identificati ma resta comunque difficile definire esattamente come la sintesi sia controllata durante lo sviluppo, in risposta agli stress e nella normale omeostasi (Valpuesta e Botella, 2004; Di Matteo *et al.*, 2010). Sebbene le piante e diversi animali possano sintetizzare l'acido ascorbico, l'uomo non ne ha la capacità a causa dell'inattività dell'enzima che catalizza l'ultimo passaggio della biosintesi ovvero la L-gulono-1,4-lattone ossidoreduttasi. La vitamina C quindi deve essere assunta attraverso la dieta (Zou *et al.*, 2006). I pomodori sono un'importante fonte di antiossidanti ed in particolare di acido ascorbico. A causa dell'alto consumo nel mondo e agli alti livelli di accumulo di AsA nel frutto (approssimativamente 4 mg/100 PF), i pomodori rappresentano uno dei maggiori contribuenti nell'apporto di questo antiossidante alla dieta umana (Willcox *et al.*, 2003).

Nel presente lavoro di tesi per i genotipi doppio omozigoti è stata effettuata un'analisi per valutare il livello di acido ascorbico in diverse condizioni di allevamento. Nel confronto tra le concentrazioni di AsA dei genotipi doppio omozigoti rispetto ai parentali IL12-4, IL7-3 e al controllo M82, è stato riscontrato un incremento del livello di AsA in tutte le condizioni di allevamento. In particolare nella condizione di pieno campo (Acerra e Battipaglia) la differenza è risultata statisticamente significativa rispetto al controllo M82 ma non rispetto alla linea parentale IL12-4; mentre nella condizione controllata di serra l'incremento non è risultato statisticamente significativo rispetto ai parentali e al controllo. Il pyramiding nei doppi omozigoti dei 2 QTL positivi per l'acido ascorbico, provenienti dalle due linee di introgressione IL12-4 e IL7-3, quindi, non ha prodotto un effetto di tipo additivo in quanto i livelli di concentrazione riscontrati nei frutti di tali piante sono simili a quelli dei genotipi donatori.

Per quanto riguarda i composti fenolici, nonostante il pomodoro sia la principale fonte di questi composti, tra cui flavonoidi e acidi idrossicinnamici e ci sia evidenza delle loro proprietà benefiche sulla salute umana (Duthie e Crozier, 2000; Pietta, 2000; Nijveldt *et al.*,

2001), esistono pochi studi sul contenuto di composti fenolici nel frutto di questa specie. La maggior parte dei lavori effettuati sono focalizzati sulla sovra-espressione dei geni codificanti per la biosintesi (Verhoeven *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2008), sui fattori di trascrizione (Bovy *et al.*, 2002) o sulla soppressione di geni regolatori (Davuluri *et al.*, 2005; Adato *et al.*, 2009). Inoltre la distribuzione dei composti fenolici in pomodoro varia ampiamente tra le varie parti della pianta, all'interno degli organi, tra i vari tessuti e a livello cellulare (Scalbert e Williamson, 2000). In generale i composti fenolici sono maggiormente concentrati negli organi aerei e nei tessuti epidermici di foglie e frutti. Anche fattori culturali ed ambientali possono influenzare la concentrazione fenolica, come mostrato da Raffo e collaboratori (2006) che riportano una variazione nei livelli dei fenoli associata alle condizioni ambientali.

In questo lavoro, come per l'AsA, è stata valutata la concentrazione dei fenoli totali nei frutti delle linee doppio omozigoti in diverse condizioni di allevamento. Gli incrementi riscontrati sono paragonabili a quelli della linea parentale IL 7-3 (QTL positivo per i fenoli) nella condizione di allevamento ad Acerra e in serra. Infine, per quanto riguarda i solidi solubili, il loro contenuto nel frutto di pomodoro è un carattere molto importante sia per i pomodori destinati all'industria di trasformazione, sia per i pomodori destinati al consumo fresco. Già in precedenza, le linee di introgressione si sono dimostrate essere un ottimo materiale per dissezionare il contenuto in solidi solubili totali. Infatti, diversi studi sono stati condotti su linee di introgressione di *S. pennellii* in diverse località. Eshed e Zamir (1995) hanno identificato 23 QTL per Brix in una prova sperimentale in Israele. Per un solo QTL identificato sulla IL2-1 l'allele della specie selvatica ha determinato una riduzione del contenuto in solidi solubili rispetto al controllo cv M82. Causse *et al.*, 2004 hanno invece identificato 9 QTL positivi per Brix. Per questo carattere l'analisi condotta sulle linee doppio omozigoti ha mostrato un incremento statisticamente significativo in tutte le condizioni di allevamento con diversi gradi di significatività, confermando anche in questo caso la presenza di un QTL positivo sulla regione 12-4.

Come accennato precedentemente, per tutti e tre i caratteri presi in esame nella progenie di questo incrocio è stata valutata l'influenza delle tre diverse condizioni di allevamento. Per quanto riguarda l'acido ascorbico le concentrazioni variano in maniera significativa solo tra il campo di Acerra rispetto al campo di Battipaglia e alla serra, mentre non si riscontrano differenze tra la condizione di campo Battipaglia rispetto alla condizione di allevamento in serra. Complessivamente, è stato riscontrato che esiste una differenza significativa dell'interazione genotipo ambiente sul contenuto di acido ascorbico nel frutto, e ciò conferma che questo carattere è soggetto a forti influenze di tipo ambientali. Per quanto riguarda fenoli

e solidi solubili le uniche differenze riscontrate si evidenziano solo tra la condizione di allevamento Acerra e quella di Battipaglia e serra, ma non tra Battipaglia e serra. Il livello di variabilità riscontrata dalle analisi di interazione genotipo-ambiente ha evidenziato l'importanza di mettere in relazione i dati ottenuti in diverse condizioni di allevamento per confermare la stabilità dei QTL e il ruolo dei fattori ambientali. Diversi studi infatti riportano che i caratteri quantitativi, controllati da molti geni, hanno una variabilità continua, fortemente influenzata dalle condizioni ambientali. La temperatura e l'intensità luminosa ad esempio esercitano un'influenza diretta sull'espressione del QTL. In effetti trovare la localizzazione genetica dei QTL è solo il primo passo del breeding. E' indispensabile anche la comprensione dei meccanismi fisiologici e delle regolazioni geniche che permettono alla pianta di adattarsi di volta in volta alle diverse condizioni ambientali (Snape *et al.*, 2007).

4.2.2 Pyramiding di QTL per carotenoidi

I carotenoidi sono responsabili della caratteristica colorazione del pomodoro e in particolare, il licopene, il più importante dei carotenoidi in pomodoro, è il composto che gli conferisce la colorazione rossa, hanno una funzione essenziale nella fotosintesi agendo come pigmenti addizionali e dunque, prevenendo danni di tipo foto ossidativi. I carotenoidi svolgono funzioni similmente protettive nell'uomo. Ad esempio, è stata trovata una correlazione tra la presenza di licopene nella dieta e una diminuzione nel cancro della prostata, sebbene gli effetti siano modesti (Giovannucci, 2002 e Etminan *et al.*, 2004). Allo stesso modo sia il beta carotene sia la provitamina A sono elementi essenziali della dieta. Altri carotenoidi presenti in pomodoro includono il fitoene, il fitofluene, lo Z-carotene, γ -carotene, β -carotene, neurosporene e luteina (Khachik *et al.*, 2002).

La naturale variabilità che esiste in popolazioni di pomodoro per il contenuto in carotenoidi può essere studiata identificando regioni sul genoma che controllano questo carattere. L'analisi QTL risulta quindi ideale per identificare i geni chiave dei tratti che regolano la qualità del frutto (Liu *et al.*, 2003). Il mapping di QTL per il colore dei frutti, ad esempio, ha rilevato 16 regioni genomiche associate alla modificazione del colore rosso e di queste, tre corrispondono a mutazioni conosciute (geni r, B e Del) (Liu *et al.*, 2003). Il mapping di geni candidati per la biosintesi di carotenoidi identifica solo 5 geni candidati che co-localizzano con QTL mostrando che il controllo genetico del contenuto in carotenoidi è complesso e si estende ben oltre il pathway biosintetico. Dieci QTL derivanti dalla specie selvatica *S.*

pennellii migliorano l'intensità del colore del frutto nonostante il frutto selvatico sia verde (Liu *et al.*, 2003).

Molti sono i progressi fatti verso la comprensione dei meccanismi genetici di regolazione della via biosintetica dei carotenoidi in pianta. Infatti, sono stati fatti molti tentativi di ingegneria metabolica per incrementare il livello di carotenoidi in pomodoro. Il pathway biosintetico dei carotenoidi è complesso ed è controllato da molti geni come isopentenil difosfato isomerasi, geranilgeranil difosfato sintasi, fitoene sintasi, fitoene desaturasi, Z-carotene desaturasi, licopene β ciclasi, licopene ϵ ciclasi, β -carotene idrossilasi (Fray e Grierson, 1993, Fraser *et al.*, 2002). Diversi studi sono stati condotti sui principali geni del pathway. Fitoene sintasi (PSY) è l'enzima che dirige irreversibilmente la formazione di carotenoidi, è il primo enzima del pathway ed è stato target di diversi studi di manipolazione genetica (Bramley *et al.*, 1992, Fray e Grierson 1993, Fraser *et al.*, 2002). Per esempio, piante transgeniche di pomodoro esprimenti l'antisenso di PSY-1 mostravano una significativa diminuzione nei livelli dei carotenoidi (fino al 97% nei fiori e frutti). Tuttavia il livello di carotenoidi in foglie non è influenzato poiché la biosintesi del fitoene è influenzata da un altro gene, PSY-2 (Bramley *et al.*, 1992).

Il contenuto di carotenoidi totali del frutto di pomodoro di linee transgeniche era da 2 a 4 volte più alto rispetto al controllo, mentre i livelli di fitoene, licopene, β -carotene e luteina erano diminuiti di 2; 4; 1,8; 2,2 volte rispettivamente. L'attività degli altri enzimi nel pathway non risultava significativamente alterata dalla presenza del PSY batterico. Questi risultati suggerivano che la presenza di un addizionale PSY riduceva gli effetti di regolazione di questo step del pathway dei carotenoidi (Fraser *et al.*, 2002).

La fitoene desaturasi (PDS) è stato un altro target dell'ingegneria genetica. Per esempio un gene batterico dei carotenoidi (*crtl*) codificante l'enzima PDS, è stato introdotto in pomodoro sotto il controllo del promotore CaMV 35S (Romer *et al.*, 2000). L'espressione di questo gene in pomodori transgenici non ha aumentato il livello dei carotenoidi totali. Infatti il livello degli enzimi del pathway che sono precedenti al beta carotene è risultato essere inferiore. Tuttavia il contenuto in β -carotene è diminuito di circa 3 volte mentre quello delle xantofille e dei tocoferoli è aumentato. L'analisi del livello dei trascritti ha rilevato che i geni endogeni dei carotenoidi sono sovra regolati eccetto che il gene PSY che è sotto regolato. Dunque sembra che, sia il β -carotene che i suoi derivati, producano un'inibizione da feedback in frutto di pomodoro (Romer *et al.*, 2000).

La sovra-espressione e la repressione antisenso del gene β LCY sotto il controllo del promotore PDS ha mostrato l'importante ruolo del gene β Lcy nella regolazione del flusso

biosintetico (Rosati *et al.*, 2000). Infatti, la sovra-espressione ha incrementato il livello di β -carotene fino a 7 volte, mentre il livello totale di carotenoidi è stato solo leggermente incrementato. In alcune linee transgeniche antisenso è stato, invece, osservato un aumento del contenuto di licopene.

Nel presente lavoro di tesi è stato analizzato il contenuto in carotenoidi delle piante doppio omozigoti (per l'introggressione 2 del cromosoma 2 e 3 del cromosoma 6), delle linee parentali e del controllo M82. In particolare è stato valutato il contenuto in *cis*-licopene, *trans*-licopene, luteina, β carotene, γ -carotene, Z-carotene, fitofluene e fitoene.

Differenze significative per i doppi omozigoti sono state messe in evidenza solo per quanto riguarda il contenuto in β -carotene e *trans* licopene. Per il β -carotene è stato verificato un incremento di circa il 35% rispetto al parentale IL6-3 nella cui regione introgressa è stato identificato, in lavori precedenti, un QTL positivo carotenoidi. Il parentale IL2-2 nonostante abbia mostrato contenuto in β -carotene minore rispetto all'altra linea parentale IL6-3, ha fatto riscontrare un valore cinque volte superiore rispetto al controllo M82 ma inferiore di 6 volte rispetto ai doppi omozigoti. Sembra quindi che il pyramiding di entrambe le introgressioni abbia avuto un effetto positivo sul contenuto totale in β -carotene tale da far supporre un effetto additivo del carattere in esame. Per quanto riguarda il *trans*-licopene è stata riscontrata una forte diminuzione del contenuto nei doppi omozigoti a confronto con il controllo M82 facendo ipotizzare una interazione negativa tra i QTL. Si può ipotizzare che in una delle due introgressioni selvatiche sia presente una forma allelica del gene licopene β ciclastasi (B- LCY) che mostra un'affinità maggiore con il substrato (licopene) e che quindi non permetterebbe l'accumulo di *trans* licopene nel frutto e allo stesso tempo produrrebbe un aumento di β carotene.

4.3 Selezione e analisi di sub-linee

Allo scopo di identificare i geni candidati al controllo del livello di acido ascorbico contenuto nei frutti di pomodoro, è stata iniziata la selezione di sub-linee della regione 12-4, che portano cioè una regione più ridotta del genoma selvatico rispetto alla linea 12-4. La caratterizzazione fenotipica di tali sub-linee può consentire di definire meglio quali zone della regione introgressa portano effettivamente i geni chiave per il controllo del livello di AsA nei frutti di pomodoro.

Le analisi molecolari condotte sulle piante F2 della progenie IL12-4xIL7-3 hanno portato alla identificazione di quattro genotipi che hanno mostrato ricombinazione in condizione eterozigote nella regione introgressa, due nella regione 7-3 e due nella regione 12-4. In particolare i genotipi F2-44 e F2-47 presentano al locus N3 del cromosoma 7 un allele eterozigote, mentre risultano omozigoti per l'allele coltivato nei loci N1 ed N2 analizzati. Nel genotipo F2-85, invece, per il cromosoma 12 si è avuta una condizione omozigote per l'allele coltivato nei loci M1 ed M2, mentre nel locus M4 il genotipo presenta l'introgressione in condizione eterozigote. Il genotipo A7-66 ha mostrato una condizione di non introgressione al locus M1 e di eterozigosi ai loci M2 e M4.

La selezione delle sub-linee è proseguita con le analisi molecolari su piante della generazione F3 allevate sia in serra che in campo ad Acerra, per poter identificare piante con eventi di ricombinazione in condizione di omozigosi. In serra sono stati allevati i genotipi provenienti dalle 4 piante ricombinanti F2 e a seguito dell'analisi molecolare sono stati individuati 3 genotipi ricombinanti, (F2-66B, F2-66C, F2-66D) che mancano del frammento selvatico al locus M2. Questi genotipi risultano essere particolarmente interessanti in quanto presentano omozigosi al locus M4. Questo caso di ricombinazione, che ha portato alla formazione di una sub-linea dell'introgressione 12-4 per il locus M4, può essere molto utile per l'identificazione di geni coinvolti nella biosintesi dell'acido ascorbico. Purtroppo non è stato possibile valutare questi due genotipi per contenuto di AsA e solidi solubili in quanto i frutti delle piante allevate in serra hanno mostrato delle forti diversità fenotipiche rispetto ai frutti normali. Infatti si presentavano come frutti piccoli, senza semi, probabilmente partenocarpici.

Le piante allevate ad Acerra sono state sottoposte all'analisi molecolare per stimare la dimensione del frammento selvatico introgresso. Sono state così individuate 4 piante con genotipo interessante. Infatti l'analisi con marcatori nella zona superiore, mediana e inferiore dell'introgressione ha messo in evidenza in questi campioni la possibilità che si sia avuta ricombinazione. In particolare i genotipi F3-85A1, F3-85C1 e F3-85C4 hanno mostrato una ridotta introgressione del genoma selvatico, ristretta alla zona terminale dell'introgressione. Il genotipo F3-66A1, invece, presenta l'allele coltivato per i marcatori M1 ed M2, mentre presenta l'allele selvatico per i marcatori M3 ed M4. In questo caso il frammento introgresso ha una dimensione maggiore rispetto a quello presente negli altri tre genotipi ricombinanti. Tali genotipi sono stati poi sottoposti all'analisi fenotipica.

La valutazione del frutto per contenuto di alcuni metaboliti ha mostrato un maggiore contenuto di AsA in tutti e quattro i casi rispetto ai parentali IL12-4 e IL 7-3 e al controllo M82 allevati nelle stesse condizioni. Solo due campioni, F3-66A1 e F3-85C4, hanno mostrato

un aumento considerevole. Il primo campione, all'analisi molecolare, è risultato essere omozigote per l'allele selvatico in posizione M3 ed M4. Ciò induce a pensare che probabilmente nella zona mediana dell'introgessione i cluster di geni, individuati dall'analisi bioinformatiche, correlati all'accumulo di acido ascorbico e posizionati tra questi due marcatori, possono essere candidati come responsabili dell'aumento di AsA. In particolare, il cluster dei geni codificanti per triptofano sintasi, potrebbe migliorare la biosintesi di precursori dell'etilene riportato essere induttore dell'accumulo di AsA. Inoltre risulta interessante anche il cluster contenente il gene codificante per una pectin-metilesterasi, che è coinvolta in una delle vie alternative della biosintesi dell'AsA. Il campione F3-85C4 ha una concentrazione inferiore di AsA rispetto al campione F3-66A1 ma comunque superiore ai parentali. Ciò che può sorprendere è che questo campione presenta la stessa condizione molecolare degli altri due ricombinanti, F3-85A1 e F3-85C1, ma questi ultimi non mostrano un aumento di AsA. Si può però ipotizzare che il segmento introgresso nei vari genotipi ricombinanti, proveniente da differenti eventi di ricombinazione, possa in realtà essere di dimensioni leggermente diverse in questi genotipi, e potrebbe portare, quindi, gruppi di geni con gli alleli di *S. pennellii* nel genotipo con un livello di AsA più elevato (F3-85C4), diversi a quelli portati dagli altri due genotipi. Infatti, tra i 2 marcatori M3 e M4 che delimitano la regione cromosomica dove è avvenuto l'evento di ricombinazione, c'è una distanza genetica di 20 cM, che corrispondono a migliaia di bp. Quindi, dato che il genoma di pomodoro è stato completamente sequenziato ed è disponibile in rete (www.solgenomics.net), si potranno ricercare altri marcatori polimorfici tra *S. pennellii* e *S. lycopersicum*, che ricadono in questa ristretta regione, e che potranno essere utilizzati per definire meglio se gli eventi di ricombinazione sono avvenuti in punti diversi, delimitando così nel dettaglio le dimensioni delle regioni introgresse nei 3 genotipi (**Figura 4.1**). Ciò potrà portare ad identificare eventuali geni candidati al controllo dell'AsA che risiedono nelle regioni introgresse, e che per il loro polimorfismo rispetto ai geni del genotipo coltivato, potrebbero giustificare il maggior livello di AsA osservato.

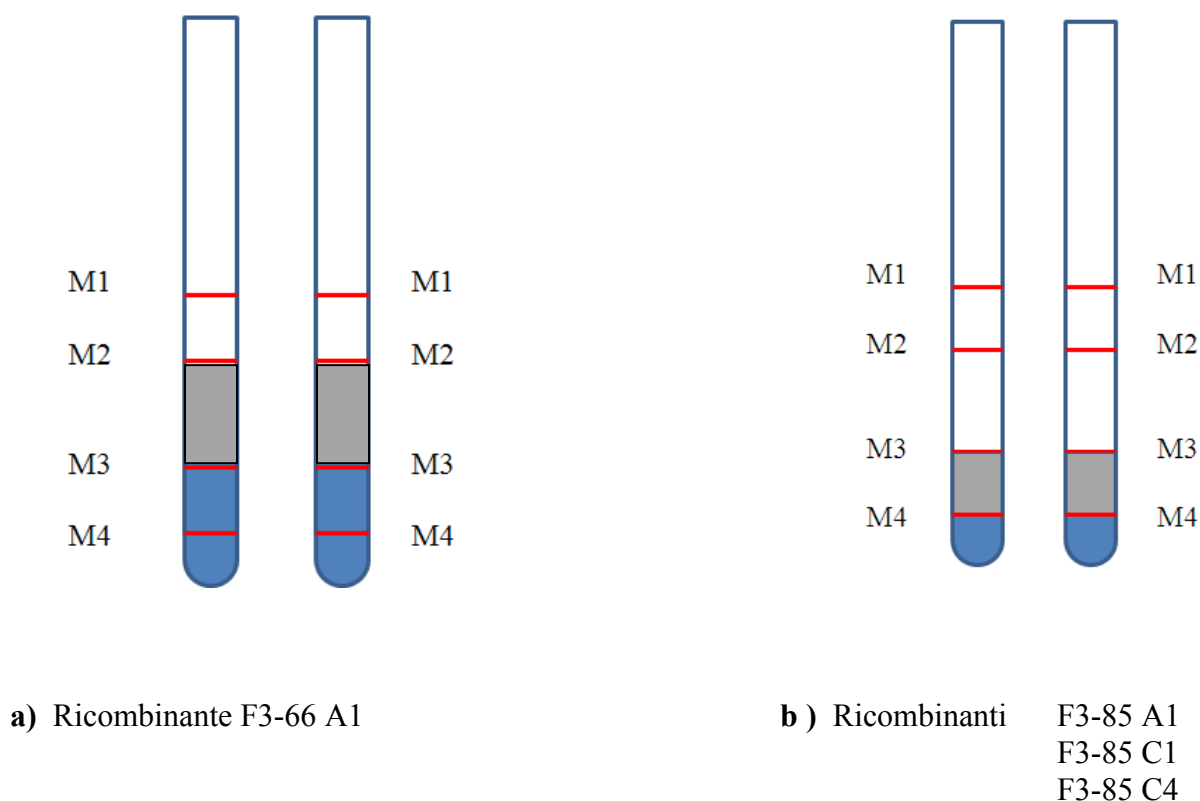


Figura 4.1 Rappresentazione grafica della condizione del cromosoma 12 nella regione 4 nei ricombinanti. In blu sono mostrate le regioni introgresse del genoma selvatico, in bianco sono mostrate le regioni di genoma della cv. M82, in grigio è mostrata la regione in cui va definito dove è avvenuto l'evento di ricombinazione.

a) Ricombinante F3-66 A1 omozigote per l'allele selvatico ai loci M3 ed M4.

b) Ricombinanti F3-85 A1, C1 e C4 omozigoti per il locus selvatico M4.

Per dissezionare la variabilità genetica del contenuto in carotenoidi della linea IL2-2 è stata effettuata un'analisi metabolica e trascrizionale sulla sub-linea IL2-2-1, già disponibile nella collezione di linee e sub-linee presente alla Cornell University. Le analisi metaboliche sul contenuto in carotenoidi sono state condotte su 5 diversi stadi di maturazione del frutto ed hanno mostrato un forte incremento per il β -carotene a partire dallo stadio di invaiatura e un decremento per il *cis*-licopene a 3 giorni dallo stato di frutto invaiato, quando confrontati con i livelli del genotipo controllo M82. L'andamento degli altri carotenoidi presi in considerazione non varia in maniera significativa tra la linea IL2-2-1 e il controllo.

Su tale sub-linea sono state effettuate le analisi trascrittomiche in tre diversi momenti della maturazione del frutto. Su 11 trascritti analizzati solo il trascritto del gene β -carotene idrossilasi (Crtr-B2) è risultato differenzialmente espresso nella prova a 7 giorni dall'invaiatura rispetto al controllo. In pomodoro sono stati isolati i due geni codificanti per la β -carotene idrossilasi (CrtR-b1 e b2) e sono state studiate le loro strutture e funzioni. (Galpaz

et al., 2006). Questi sono responsabili della conversione del β -carotene a zeaxantina, CrtR-b1 è espresso nelle foglie, mentre CrtR-b2 è attivo esclusivamente nel fiore. Entrambi i geni sono stati mappati utilizzando linee di introgressione: il primo è stato mappato nella linea IL 6-1, il secondo è stato mappato nella IL 3-2 sul braccio corto del cromosoma 3, ma non nella IL 3-1 (Liu *et al.*, 2003). Entrambi i geni codificano per le isoforme attive del β -carotene idrossilasi che catalizza l'idrossilazione del carbonio 3 e 3' nell'anello β del β carotene. L'aumento di espressione dell'enzima β -carotene porta a un incremento del contenuto del ciclo delle xantofille e delle zeaxantine nella membrana dei cloroplasti (Davidson *et al.*, 2002). In pomodoro sono state ottenute diverse linee e varietà con un contenuto elevato in licopene e β -carotene (Fraser *et al.*, 2007), con notevoli esempi che riguardano l'accumulo del β -carotene (D'ambrosio *et al.*, 2004), dei carotenoidi totali (Fraser *et al.*, 2007) e dei ketocarotenoidi (Ralley *et al.*, 2004). In questo lavoro non si evidenziano differenze trascrizionali che possano giustificare il maggiore accumulo di β -carotene e il decremento in *cis* licopene, tuttavia l'abbondanza di β -carotene potrebbe spiegare gli alti livelli del trascritto del gene CrtR-b2 essendo substrato di questo enzima. E' inoltre ipotizzabile un aumento delle concentrazioni dei metaboliti a valle del β -carotene come le xantofille e le zeaxantine e ulteriori indagini saranno condotte per validare questa ipotesi.

5 Conclusioni

Il presente progetto di ricerca è stato finalizzato a realizzare il pyramiding di QTL per il controllo di antiossidanti in pomodoro. Il lavoro è stato condotto su generazioni di piante F2 e F3 provenienti da incroci tra linee di introgressione di *S. pennellii* in *S. lycopersicum*. In particolare l'incrocio tra le linee IL12-4 e IL7-3 ha permesso di cumulare QTL per un maggiore contenuto in fenoli totali, ascorbato (AsA) e solidi solubili, mentre l'incrocio tra le linee IL6-3 e IL2-2 ha consentito di identificare genotipi con un elevato contenuto in β carotene nel frutto.

L'attività di ricerca ha portato alla realizzazione dei seguenti risultati:

- identificazione di 13 marcatori molecolari polimorfici tra *S. lycopersicum* e *S. pennellii*, nello specifico 3 marcatori polimorfici per la regione 3 del cromosoma 7, 4 marcatori per la regione 4 del cromosoma 12, 3 marcatori per la regione 2 del cromosoma 2 e 3 marcatori per la regione 3 del cromosoma 6;
- selezione di 4 genotipi con entrambe le introgressioni (IL12-4 e IL7-3) in omozigosi (doppi omozigoti) mostranti un QTL per AsA, fenoli e solidi solubili totali, tutti responsabili di un incremento dei tre metaboliti;
- selezione di 5 genotipi doppio omozigoti per le introgressioni 2-2 e 6-3 mostranti un QTL positivo per β carotene e uno negativo per *trans* licopene;
- selezione di 4 genotipi sub linee della regione introgressa 12-4, esprimenti un contenuto in AsA superiore a quello riscontrato nel controllo M82.
- identificazione nella sub linea IL 2-2-1 di un QTL positivo per β carotene e uno negativo per il *cis* licopene. Inoltre si è evidenziata nella stessa sub linea la sovra espressione del gene β carotene idrossilasi rispetto al controllo M82.

La variabilità riscontrata nel livello di antiossidanti studiati ha indicato che ulteriori prove dovranno essere condotte sia in diverse condizioni di allevamento che in diversi anni in modo da poter confermare la stabilità dei QTL identificati e il ruolo dei fattori ambientali.

Inoltre, altre analisi dovranno essere condotte sulle sub linee della IL12-4 con nuovi marcatori molecolari, allo scopo di definire meglio la dimensione del frammento introgresso. Tali piante dovranno poi essere allevate in diverse condizioni ambientali, per poter identificare i geni candidati associati al maggiore accumulo di AsA nelle diverse piante.

Questi risultati dimostrano che l'utilizzo di marcatori molecolari è uno strumento molto importante per il miglioramento genetico per caratteri quantitativi come la produzione di acido ascorbico, fenoli totali, carotenoidi e solidi solubili totali.

Prospettive future riguardano l'analisi trascrittomiche dei genotipi selezionati allo scopo di risalire ai geni responsabili dell'accumulo di antiossidanti nel frutto di pomodoro, nonché la ricerca di polimorfismi presenti nelle regioni introgresse mediante tecniche di next generation sequencing.

6 Bibliografia

- Adato A., Mandel T., Mintz-Oron S., Venger I., Levy D., Yativ M., Domínguez E., Wang Z., De Vos R., Jetter R., Schreiber L., Heredia A., Rogachev I., Aharoni A.** (2009). Fruit-Surface Flavonoid Accumulation in Tomato Is Controlled by a SIMYB12-Regulated Transcriptional Network *PLoS Genet.* **5**(12): e1000777.
- Agius F., Gonzalez-Lamothé R., Caballero J.L., Muñoz-Blanco J., Botella M.A., Valpuesta V.** (2003). Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a Dgalacturonic acid reductase. *Nat Biotechnol* **21**, pp. 177–181.
- Alba R., Payton P., Fei Z., Mc Quinn R., Debbie P., Martin G., Tanksley S., Giovannoni J.** (2005). Transcriptome and selected metabolite analysis reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *The plant cell* **17**: 2935-2965.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215** (3): 403–410.
- Andersen W.R., Fairbanks D.J.** (1990). Molecular markers: important tools for plant genetic resource characterization. *Diversity*, **6** (3,4):51-53.
- Asada K.** (1992). Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, **85**: 235-241.
- Ashikari M., Matsuoka M.** (2006) Identification, isolation and pyramiding of QTL for rice breeding. *Trends Plant Sci* **11**(7): 344-350.
- Bai Y., Lindhout P.** (2007) Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany*; **100**:1085-1094.
- Baladrin M.F., Klocke J.A., Wurtele V.S., Bollinger W.H.,** (2005) Prodotti chimici naturali delle piante: Fonti di materiali industriali e medicinali. *Scienze* **228**: 1154-60.
- Berliner J.A., Heinecke J.W.** (1996) The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Rad. Biol. Med.*, **20**: 770-777.
- Block G., Jensen C., Dietrich M., Norkus E.P., Hudes M., Packer L.** (2004). Plasma C-reactive protein concentrations in active and passive smokers: Influence of antioxidant supplementation. *Journal of the American College of Nutrition* **23**(2): 141–147.
- Bovy A., de Vos R., Kemper M., Schijlen E., Pertejo M.A., Muir S., Collins G., Robinson S., Verhoeven M., Hughes S., Santos-Buelga C., van Tunen A.** (2002). High-Flavonol Tomatoes Resulting from the Heterologous Expression of the Maize Transcription Factor Genes *LC* and *Cl*. *Plant Cell*. **14**, pp. 2509–2526.

- Bramley P.M., Teulieres C., Blain I., Bird C., Schuch W.** (1992) Biochemical characterisation of transgenic tomato plants in which carotenoid synthesis has been inhibited through expression of antisense RNA to pTOM5. *The Plant Journal* **2**, 343–349.
- Breitenbach J. and Sandmann G.**, (2005) Zeta-Carotene cis isomers as products and substrates in the plant poly-cis carotenoid biosynthetic pathway to lycopene. *Planta*, **220** pp. 785–793.
- Brouwer D.J., St Clair D.A.** (2004). Fine mapping of three quantitative trait loci for late blight resistance in tomato using near isogenic lines (NILs) and sub-NILs. *Theor Appl Genet* **108**, pp. 628–638.
- Buring J.E., Hennekens C.H.** (1997). Antioxidant vitamins and cardiovascular disease. *Nutr. Rev.* **55**, S53-S60.
- Cassidy A.** (1996) Physiological effects of phytoestrogens in relation to cancer and other human health risks. Proc. Symp. On Physiologically Active Substances in Plant Foods (Non-Nutritive Nutrient); Cambridge University Press: London.
- Castelluccio C., Paganga G., Melikian N., Bhaktiar C., Bolwell G. P., Pridham J., Sampson J., Rice-Evans C. A.** (1995). Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Letters* **368**:188-192.
- Causse M., Duffe P., Gomez M.C., Buret M., Damidaux D., Zamir D., Gur A., Chevalier M., Lemaire-Chamley M., Rothan C.** (2004). A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition. *Journal of Experimental Botany* **403**, pp. 1671–1685.
- Cazzonelli C.I.** (2009). Regulation of carotenoid composition and shoot branching in *Arabidopsis* by a chromatin modifying histone methyltransferase, SDG8. *Plant Cell.*, **21** 1, pp. 39–53.
- Cazzonelli C.I., Pogson B. J.** (2010) Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Cell* **15** n 5 266-274
- Chaib J., Lecomte L., Buret M., Causse M.** (2006). Stability over genetic backgrounds, generations and years of quantitative trait locus (QTLs) for organoleptic quality in tomato. *Theor. Appl. Genet.* **112**, pp. 934–944.
- Chang A., Lim M.H., Lee S., Robb J., Nazar R N.J.** (2008). Tomato Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene Family, Highly Redundant but Strongly Underutilized *Biol Chem.* **28**; 283(48): 33591–33601.

Chen Q., Fischer A., Reagan J.D., Yan L.J., Ames B.N. (1995). Oxidative damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **92**: 4337-4341.

Chen Z., Young T.E., Ling J., Chang S.C., Gallie D.R. (2003). Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, pp. 3525–3530.

Clinton S. K. (1998). Lycopene: chemistry, biology and implications for human health and disease. *Nutr. Rev.*, **56**:35-51.

Conklin P.L., Gatzek S., Wheeler G.L., Dowdle J., Raymond M.J., Rolinski S., Isupov M., Littlechild J.A., Smirnoff N. (2006). Arabidopsis thaliana VTC4 encodes L-galactose-1-P phosphatase, a plant ascorbic acid biosynthetic enzyme. *J Biol Chem* **281**, pp. 15662–15670.

Conklin P.L., Norris S.R., Wheeler G.L., Williams E.H., Smirnoff N., Last R.L. (1999). Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, pp. 4198–4203.

Conklin P.L., Saracco S.A., Norris S.R., Last R.L. (2000). Identification of ascorbic acid-deficient Arabidopsis thaliana mutants. *Genetics* **154**, pp. 847–856.

Conklin P.L., Barth C. (2004). Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant Cell Environment*. **27**:959-970.

Conklin P.L., Saracco S.A., Norris S.R., Last R.L. (2000). Identification of ascorbic acid-deficient Arabidopsis thaliana mutants. *Genetics* **154**, pp. 847–856.

Cordoba E. (2009). Unravelling the regulatory mechanism that modulate the MEP pathway in higher plants. *J. Exp. Bot.* **60**, 2933-2943

Cossins E., Lee R., Packer L. (1998). ESR studies of vitamin c regeneration, order of reactivity of natural source phytochemical preparation. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **45**, 583-597.

Cruz-Rus E., Botella M.A., Valpuesta V., Gomez-Jimenez M.C. (2010). Analysis of genes involved in L-ascorbic acid biosynthesis during growth and ripening of grape berries. *Journal of Plant Physiology*. **167(9)**:739-48.

Cuttriss A.J. (2007). Regulation of lutein biosynthesis and prolamellar body formation in Arabidopsis. *Funct. Plant Biol.*, **34** pp. 663–672

- Czczot H.** (2000) Biological activities of flavonoids—A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **950**(4): 3–13.
- D'Ambrosio C., Stigliani A.L., Giorio G.** (2010). Overexpression of CrtR-b2 (carotene beta hydroxylase 2) from *S. lycopersicum* L. differentially affects xanthophyll synthesis and accumulation in transgenic tomato plants. *Transgenic Res.* **20**(1):47-60.
- Davey M. W., van Montagu M., Inze D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N. et al.** (2000). Plant Lascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**: 825–860.
- Davison P.A., Hunter C.N., Horton P.** (2002). Overexpression of beta-carotene hydroxylase enhances stress tolerance in Arabidopsis. *Nature* **418**:203–206
- Davuluri G.R., van Tuinen A., Fraser P.D., Manfredonia A., Newman R., Burgess D., Brummell D.A., King S.R., Palys J., Uhlig J., et al** (2005). Fruit-specific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nat Biotechnol* **23**, pp. 890–895
- Dixon R.A.** (2005). Engineering of plant natural product pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, pp. 329–336.
- Di Mascio P., Kaise S., Sies H.** (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid single oxygen quencher. *Arzn. Biochem. BioPhys.*, **274**:532-538.
- Di Matteo A., Sacco A., Anacleria M., Pezzotti M., Delledonne M., Ferrarini A., Frusciante L., Barone A.** (2010). The ascorbic acid content of tomato fruits is associated with the expression of genes involved in pectin degradation. *BMC Plant Biology*. **10**:163.
- Dong H., et al.** (2007). The Arabidopsis Spontaneous Cell Death1 gene, encoding a zeta-carotene desaturase essential for carotenoid biosynthesis, is involved in chloroplast development, photoprotection and retrograde signalling. *Cell Res.*, **17** pp. 458–470.
- Duthie G., Crozier A.** (2000). Plant-derived phenolic antioxidants. *Current Opinion in Lipidology* **11**, pp. 43–47.
- Eshed, Y., and D. Zamir.** (1994a). Introgressions from *Lycopersicon pennellii* can improve the soluble solids yield of tomato hybrids, *Theor. Appl. Genet.* **88**: 891-897
- Eshed, Y., and D. Zamir.** (1994b). A genomic library of *Lycopersicon pennellii* in *L. esculentum*: a tool for fine mapping of genes. *Euphytica* **79**: 175-179

Eshed Y., Zamir D. (1995). An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTLs. *Genetics* **141**, pp. 1147–1162.

Eskling, M., Arvidsson, P.-O. e Akerlund, H.-E. (1997). The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiologia Plantarum*, **100**: 806-816.

Etminan M., Takkouche B., Caamano-Isorna F. (2004). The role of tomato products and lycopene in the prevention of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **13**:340-345.

Finkers R., van Heusden A.W., Meijer-Dekens F., van Kan J.A., Maris P., Lindhout P. (2007). The construction of a *Solanum habrochaites* LYC4 introgression line population and the identification of QTLs for resistance to *Botrytis cinerea*. *Theor Appl Genet* **114**, pp. 1071–1080.

Foyer C., e Halliwell, B. (1976). Presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, **133**: 21-25.

Franceschi S., Bidoli E., La Vecchia C., Talamini R., D'Avanzo B., Negri E. (1994). Tomatoes and risk of digestive-tract cancers. *Int. J. Cancer*, **59**:181-184.

Frankel E.N., Kanner J., German J.B., Parks E., e Kinsella J.E. (1993). Inhibition of oxidation of human low density lipoproteins by phenolic substances in red wine. *Lancet* **43**: 454-457.

Fray, R.G., and Grierson, D. (1993). Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression. *Plant Mol. Biol.* **22**, 589–602.

Frary A., Doganlar S., Frampton A., Fulton T., Uhlig J., Yates H., Tanksley S. (2003). Fine mapping of quantitative trait loci for improved fruit characteristics from *Lycopersicon chmielewskii* chromosome 1. *Genome* **46**, 235–243.

Fraser P.D., Romer S., Shipton C.A., Mills P.B., Kiano J.W., Misawa N., Drake R.G., Schuch W., Bramley P.M. (2002). Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 1092–1097.

Fraser P.D., Enfissi E.M.A., Halket J.M., Truesdale M.R., Yu D., Gerrish C., Bramley P.M. (2007). Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism. *Plant Cell* **19**:3194–3211

- Frary A., Fulton T. M., Zamir D., e Tanksley S. D.,** (2004). Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum*×*L. pennellii* cross and identification of possible orthologs in the Solanaceae,” *Theoretical and Applied Genetics*, vol. **108**, no. 3, pp. 485–496.
- Galpaz N., Ronen G., Khalfa Z., Zamir D., Hirschberg J.** (2006). A chromoplast-specific carotenoid biosynthesis pathway is revealed by cloning of the tomato white-flower locus. *Plant Cell* **18**:1947–1960.
- Granjewala D.** (2009). An account of cloned genes of methyl-erythritol-4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Curr. Issues Mol Biol* **11**, 35-45.
- Gey K.F.** (1998). Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. A critical and constructive review of epidemiology and supplementation data regarding cardiovascular disease and cancer. *Biofactors*, **7**: 113-174.
- Giovannucci E., Ascherio A., Rimm E. B., Meir J., Stampfer M. I., Colditz C. A., Willer W. C.** (1995). Intake of carotenoids and Retinol in relation to risk of prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **87**:1767-1767.
- Giovannucci, E., Rimm, E. B., Liu, Y., Stampfer, M. J. & Willett, W. C.** (2002). A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**:391-398.
- Giuliano G., Aquilani R., Dharmapuri S.** (2000). Metabolic engineering of plant carotenoids. *Trends Plant Sci*, **5**:406-409.
- Goff S., Klee H.** (2006). Plant Volatile Compounds: Sensory Cues for Health and Nutritional Value? *Science* **311**, pp. 815–819.
- Green M.A., Fry S.C.** (2005). Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-Ooxalyl- L-threonate. *Nature* **433**, pp. 83–87.
- Gur A., Zamir D.,** (2004). Unrised natural variation can lift yield barriers in plant breeding. *PLOS Biol* **2** 10:245.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C.** (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: overview. *Methods Enzymol.* **186**: 1-85.
- Hartborne J.B., Williams C.A.** (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481-504.
- Havsteen B.H.** (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* **96**: 67-202.

- Heim K., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J.** (2002). Flavonoid antioxidant: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, **13**: 572-584.
- Henna R., Sugawara H., Koike T., Lopez R., Gibson T.J., Higgins D.G., Thompson J.D.** (2003). "Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs". *Nucleic Acids Res* **31** (13): 3497–3500.
- Herbert V.** (1996). Introduction of the symposium: prooxidant effect of antioxidant vitamins. *J. Nutr.*, **126**:1197S-1200S.
- Horemans N., Foyer C.H., Asard H.** (2000). Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends Plant Sci* **5**, pp. 263–267.
- Hospital F., Chevalet C., Mulsant P.** (1992). Using markers in gene introgression breeding programs. *Genetics*, **132**:1199-1210.
- Iriti M., Foaro F., Sant S., Maffi D., Appiano A.**, (2003). Chitosan-elicited resistance to plant viruses: a histochemical and cytochemical study. Muzzarelli RAA. In *Chitin Enzimology*; Atec, Italy 57-62.
- Isaacson T.** (2004). Analysis in vitro of the enzyme CRTISO establishes a poly-cis-carotenoid biosynthesis pathway in plants. *Plant Physiol.*, **136**, pp. 4246–4255.
- Jarvis P., Lister C., Szabo V., Dean C.** (1994). Integration of CAPS markers into the RFLP map generated using recombinant inbred lines of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, **24**:685-687.
- Kampfenkel K., Van Montagu M., and Inzè D.** (1995). Extraction and determination of Ascorbate and Dehydroascorbate from Plant Tissue. *Analytical Biochemistry* **225**:165-167.
- Karlova R., Rosin F.M., Busscher-Lange J., Parapunova V., Do P.T., Fernie A.R., Fraser P.D., Baxter C., Angenent G.C., de Maagd R.A.** (2011). Transcriptome and metabolite profiling show that APETALA2a is a major regulator of tomato fruit ripening. *Plant Cell* **23**(3):923-41.
- Kato N., Esaka M.** (1999). Changes in ascorbate oxidase gene expression and ascorbate levels in cell division and cell elongation in tobacco cells. *Physiologia Plantarum*, **105**: 321-329.
- Khachik F., Carvalho L., Bernstein P.S., Muir G.J., Zhao D.Y., Katz N.B.** (2002). Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. *Exp Biol Med* (Maywood) **227**, pp. 845–851.
- Konieczny A., Ausubel F. M.** (1993). A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using

co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.*, **4**(2):403-410.

Kuntz S., Wenzel U., Daniel H. (1999). Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European Journal of Nutrition* **38**(3):133–142.

Lande R., Thompson R. (1990). Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics*, **124**:743-756.

Lawson D.M., Lunde C.F., Mutschler M.A. (1997). Marker-assisted transfer of acylsugar-mediated pest resistance from the wild tomato *L. pennellii* to the cultivated tomato *Lyc. esculentum*. *Molecular breeding* **3**:307-317.

Lefebvre V., Chèvre A. M. (1995). Tools for marking plant disease and pest resistance genes: a review. *Agronomie* **15**, p. 3-19.

Levy J., Bosin E., Feldman B., Giat Y., Miinste A., Danilenko M., Sharoni Y. (1995). Lycopene is a potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either alfa-carotene or beta-carotene. *Nutr. Cancer*, **24**:257-266.

Li F. (2008). The mayze phytoene synthase gene family: overlapping roles for carotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and thermal stress tolerance. *Plant Physiol.* **147**, 1334-1346.

Li F. (2008). PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the Poaceae and regulator of abiotic stress induced root carotenogenesis. *Plant Physiol.* **146**, 1333-1345.

Liebler D. C., Kling D. S., Reed. D. J. (1986). Antioxidant protection of phospholipid bilayers by a-tocopherol. *J. Biol. Chem.*, **261**:12114-12119.

Lippman Z.B., Semel Y., Zamir D. (2007). An integrated view of quantitative trait variation using tomato interspecific introgression lines. *Current Opinion in Genetics & Development* **17**, pp. 545–542.

Liu YS., Gur A., Ronen G., Causse M., Damidaux R., Buret M., Hirschberg J., Zamir D. (2003). There is more to fruit colour than candidate carotenoid genes. *Plant Biotechnology Journal* **1**, pp. 195–207.

Liu J., Cong B., and Tanksley S.D. (2003a). Generation and analysis of an artificial gene dosage series in tomato to study the mechanisms by which the cloned quantitative trait locus fw2.2 controls fruit size. *Plant Physiol.* **132**, pp. 292–299.

- Miller N.J., Diplock A.T., Rice-Evans C.A.** (1995). Evaluation of the total antioxidant activity as a marker of the deterioration of apple juice on storage. *J. Agric. Food Chem.*, **43**: 1794-1801.
- Miller J.C., Tanksley S.D.** (1990). RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics* **80**, pp. 437–448.
- Mitscher L.A., Young M., Shankel D., Dou j.H., Steele L., Pillai S.P.** (1997). Chemoprotection: A review of the Potential Therapeutic Antioxidant Properties of Green Tea (*Camelia sinensis*) and Certain its Constituents. *Med. Res. Rev.*, **17**: 327-365.
- Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna. T.G., Yano, M., Bhatia, C.R. and Sasaki, T.** (1997). Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Mol. Breeding* **3**:87-103
- Monforte A.J., Tanksley S.D.** (2000). Development of a set of near isogenic and backcross recombinant inbred lines containing most of the *Lycopersicon hirsutum* genome in a *L. esculentum* genetic background: a tool for gene mapping and gene discovery. *Genome* **43**, pp. 803–813.
- Morris C.E., and Sands D.C.** (2006). The breeder's dilemma—Yield or nutrition? *Nat. Biotechnol.* **24**, pp. 1078–1080.
- Mueller L.A., Tanksley S.D., Giovannoni J. J., van Eck J., Stack S., Choi D., Byung D. K., Chen M., Cheng Z., Li C., Ling H., Xue Y., Seymour G., Bishop G., Glenn B., Sharma R., Khurana J., Tyagi A., Chattopadhyay D., Singh N.K., Stiekema W., Lindhout P., Jesse T., Lankhorst R. K., Bouzayen M., Shibata D., Tabata S., Granell A., Botella M. A., Giuliano G., Frusciante L., Causse M. and Zamir D.** (2005). The Tomato Sequencing Project, the first cornerstone of the International Solanaceae Project (SOL). *Comparative and Functional Genomics* **6**: 153 -158.
- Moyano E., Martinez-Garcia JF., and Martin C.** (1996). Apparent redundancy in *myb* gene function provides gearing for the control of flavonoid biosynthesis in *Antirrhinum* flowers. *Plant Cell*, **8**:1519-1532.
- Niggeweg R., Kocher T., Gentzel M., Buscaino A., Taipale M., Akhtar A., Wilm, M.** (2006). A general precursor ion-like scanning mode on quadrupole-TOF instruments compatible with chromatographic separation. *Proteomics* **6**, pp. 41–53.
- Nijveldt R.J., van Nood E., van Hoorn D.E.C., Boelens P.G., van Norren K., van Leeuwen P.A.M.** (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* **74**, pp. 418–425.

Noctor G., Foyer C.H. (1998). Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**, pp. 249–279.

Oksman-Caldentey KM and Inzè D. (2004). Plant cell factories in the post genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*, **9**: 433-440.

Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K., Levine, M. (2003). Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J. Am. Coll. Nutr.*, **22**(1): 18-35.

Padh, H. (1990). Cellular functions of ascorbic acid. *Biochemistry and cell Biology*, **68**: 1166-1173.

Pallanca J.E., Smirnoff N. (2000). The control of ascorbic acid synthesis and turnover in pea seedlings. *J Exp Bot* **51**, pp. 669–674.

Palozza P. (1998). Prooxidant actions of carotenoids in biologic systems. *Nutr. Rev.*, **56**: 257-265.

Pan Q., Liu Y.S., Budai-Hadrian O., Sela M., Carmel-Goren L., Zamir D., Fluhr R. (2000). Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and *Arabidopsis*. *Genetics* **155**, 309–322.

Pastori G.M., Kiddle G., Antoniw J., Bernard S., Veljovic-Jovanovic S., Verrier P.J., Noctor G., Foyer C.H. (2003). Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell* **15**, pp. 939–951.

Peleman J.D., van der Voort J.R. (2003). Breeding by design. *Trends Plant Sci* **8**, pp. 330–334.

Pietta P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* **63**, pp. 1035–1042.

Povero G, Gonzali S, Bassolino L, Mazzucato A, Perata P. (2011). Transcriptional analysis in high-anthocyanin tomatoes reveals synergistic effect of Aft and atv genes. *Plant Physiol.* **168**(3):270-9.

Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., Rafalsky A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (micro-satellite) markers for germoplasm analysis. *Mol Breed*, **2**:225-238.

Raffo A., La Malfa G., Fogliano V., Maiani G., Quaglia, G. (2006). Seasonal variations in

antioxidant components of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1). *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, pp. 11–19.

Ralley L., Enfissi E.M., Misawa N., Schuch W., Bramley P.M., Fraser P.D. (2004). Metabolic engineering of ketocarotenoid formation in higher plants. *Plant J* **39**:477–486.

Rayle, D.L. e Cleland, R.E. (1992). The acid growth theory of auxine-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, **99**: 1271-1274.

Rein D., Schijlen E., Kooistra T., Herbers K., Verschuren L., Hall R., Sonnewald U., Bovy A., Kleemann, R. (2006). Transgenic flavonoid tomato intake reduces C-reactive protein in human C-reactive protein transgenic mice more than wild-type tomato. *J. Nutr.* **136**, pp. 2331–2337.

Renaud S. C., Gueguen R., Schenker J., d'Houtaud A. (1998). Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. *Epidemiology*, **9**:184-188.

Rice-Evans C., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Rad. Res.* **22**: 375-383.

Rice-Evans C., Sampson J., Bramley P. M., Holloway D.E. (1997). Why do we expect carotenoids to be antioxidants in vivo. *Free Radical Research* **26**: 381–398.

Robards K., Antolovich M. (1997). Analytical chemistry of fruits bioflavonoids A review. *Analyst* **122**: 11R-34R.

Romer S., Fraser P. D., Kiano J. W., Shipton C. A., Misawa N., Schuch W., Bramley P. M., (2000). Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants. *Nat Biotechnol*, **18**:666-669.

Ronen G., Cohen M., Zamir D., Hirschberg J. (1999). Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is downregulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. *Plant J.*, **17**:341-351

Rosati C., Aquilani R., Dharmapuri S., Pallara P., Marusic C., Tavazza R., Bouvier F., Camara B., Giuliano G. (2000). Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. *The Plant Journal* **24**,413–419.

Rousseaux M.C., Jones C.M., Adams D. (2005). QTL analysis of fruit antioxidants in tomato using *Lycopersicon pennellii* introgression lines. *Theor. Appl. Genet.* **111**, pp. 1396–1408.

- Salah N., Miller N.J., Paganga G.G., Tijburg L., Rice-Evans C.A.** (1995). Polyphenolic flavonols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* **322**: 339-346.
- Salvi S., Tuberosa R.** (2005). To clone or not clone plant QTLs: present and future challenges. *Trends in Plant Science*, **10**: 297-304.
- Saito, K. e Loewus, F.A.** (1979). The metabolism of 6-14C L-ascorbic acid in detached leaves. *Plant Cell Physiol*, **76**: 170-174.
- Salvi S., Tuberosa R.** (2005). To clone or not clone plant QTLs: present and future challenges. *Trends in Plant Science*, **10**: 297-304.
- Sato, P., Udenfriends, S.** (1978). Scurvy-prone animals, including man, monkey and guinea pig do not express the gene for gulonolactone oxidase. *Arch Biochem Biophys*, **71**: 293-299.
- Sax K.** (1923). The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics*, **8**:552-560.
- Scaltber A., Williamson G.** (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* **130**, pp. 2073S-2085S.
- Schauer N., Semel Y., Roessner U., Gur A., Balbo I., Carrari F., Pleban T., Perez-Melis A., Bruedigam C., Kopka J., Willmitzer L., Zamir D., Fernie A.R.** (2006). Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement, *Nat Biotechnol* **24**, pp. 447–454.
- Shadle GL., Wesley SV., Korth KL., Chen F., Lamb C., Dixon RA.,** (2003). Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochemistry*, **64**:153-151.
- Shahidi F., Naczk M.** (1995). Food Phenolics, sources chemistry effects applications. Technomic Publishing Company, USA, 109-114, 171-191, 235-273, 281-313.
- Singleton V.L., Rossi J.A** (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**, pp. 144–158.
- Smirnoff, N. e Pallanca, J.E.** (1996). Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, **24**: 472-478.
- Smirnoff N., Wheeler G.L.** (2000). Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **35**, pp. 291–314.

Snape J.W., Foulkes M.J., Simmonds J., Leverington M., Fish L.J., Wang Y., Ciaravella M. (2007). Dissecting gene X environmental effects on wheat yields via QTL and physiological analysis. *Euphytica* **154**, pp. 401–408.

Steinmetz K., Potter J. (1996). Vegetables, fruit and cancer prevention: a review. *J. Am. Diet. Assoc.*, **96**, 1027-1038.

Stahl W., Sies H. (2001). Protection against solar radiation—protective properties of antioxidants. In: Giacomoni, P.U. (Ed.), *Sun Protection in Man*. Elsevier Science BV, 561-572.

Tanksley S. D. (1983). Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Rep.*, **1**(1):3-8.

Staub J. E., Serquen F. C., Gupta M. (1996). Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Hort Sci*, **31**:729-741.

Stevens, R.; Buret, M.; Garchery, C. C.; Carretero, Y.; Causse, M. (2006). Technique for Rapid, Small-Scale Analysis of Vitamin C Levels in Fruit and Application to a Tomato Mutant Collection. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 6159-6165.

Stevens R., Buret M., Duffé P., Garchery C., Baldet P., Rothan C., Causse M. (2007). Candidate Genes and Quantitative Trait Loci Affecting Fruit Ascorbic Acid Content in Three Tomato Populations. *Plant Physiology* **143**, pp.1943-1953.

Temple N. J. (2000). Antioxidants and disease: more questions than answers. *Nutrition Research*, **20**:449-459.

Tiwari K., Paliyath G. (2011). Microarray analysis of ripening-regulated gene expression and its modulation by 1-MCP and hexanal. *Plant Physiol Biochem.* **49**(3):329-40.

Vallejos C. E., Tanksley S. D. (1983). Segregation of isozyme markers and cold tolerance in an interspecific backcross of tomato (*Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon hirsutum*). *Theoretical and Applied Genetics*, **66**:241-247.

Valpuesta V., Botella MA., (2004). Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathway for an old antioxidant. *TRENDS in Plant Science* **9** n12: 573-577.

van der Knaap E., Sanyal A., Jackson S.A., Tanksley S.D. (2004). High-Resolution Fine-Mapping and FISH analysis of sun, a Locus Controlling Tomato Fruit Shape, Reveals a Region of the Tomato Genome Prone to DNA Rearrangements. *Genetics* **168**, pp. 2127–2140.

Verhoeven M.E., Bovy A., Collins G., Muir S., Robinson S., de Vos C.H.R., Colliver S. (2002). Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid

biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany* **53**, pp. 2099-2106.

Verport R., Memelink J., (2000). Engineering secondary metabolite production in plants. *Current opinion in plant biology*, **13**:181-187.

Welsh R. (2000). Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis during photomorphogenesis. *Planta* **211**, 846-854.

Wheeler, G. L., Jones, M. A., Smirnoff, N. (1998). The biosynthetic pathway of Vitamin C in higher plants. *Nature* **393**: 365-369.

Willcox J.K., Catignani G.L., Lazarus S. (2003). Tomatoes and cardiovascular health. *Crit Rev Food Sci Nutr* **43**, pp. 1–18.

Wink M., (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, **64**:3-19.

Wiseman H., Halliwell B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progressive to cancer. *Biochem. J.*, **313**: 17-29.

Wolucka B.A., Goossens A., Inze D. (2005). Methyl jasmonate stimulates the de novo biosynthesis of vitamin C in plant cell suspensions. *J Exp Bot* **56**, pp. 2527–2538.

Wu F., Tanksley S.D. (2010). Chromosomal evolution in the plant family Solanaceae. *BMC Genomics* **17**;11:182.

Zamir D. (2001). Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature Reviews | Genetics* **2** pp.983-989.

Zhang Y., Stommel J. R. (2000). RAPD and AFLP tagging and mapping of Beta (B) and Beta modifier (Mo-B), two genes which influence beta-carotene accumulation in fruit of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Theor. Appl. Genet.*, **100**:368-375.

Zile M.H. (1998). Vitamin A and embryonic development: an overview. *The Journal of Nutrition* **128**: 455S–458S.

Zou L., Ouyang L.H., Zhang B., Ye J.Z. (2006). Cloning and mapping of genes involved in tomato ascorbic acid biosynthesis and metabolism. *Plant Sci* **170**, pp. 120–127.

<http://agri.istat.it>

<http://faostat.fao.org>

www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/dbEST/

<http://sgn.cornell.edu>

<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>